



Obtenção de microrganismos solubilizadores com potencial valor ecológico para uma agricultura sustentável

Paula Cristina Mota Rodrigues

Dissertação para obtenção do grau de Mestre em
Engenharia do Ambiente

Orientadora: Doutora Amarílis Paula Alberti de Varennes e Mendonça

Júri:

Presidente: Doutora Elizabeth da Costa Neves Fernandes de Almeida Duarte, Professora Catedrática do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa.

Vogais: Doutora Amarílis Paula Alberti de Varennes e Mendonça, Professora Catedrática do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa;

Doutora Cláudia Saramago de Carvalho Marques dos Santos Cordovil, Professora Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa.

Lisboa, 2013

Agradecimentos

A realização da presente tese de mestrado não seria possível sem o precioso apoio da minha orientadora, a Professora Catedrática Amarílis Paula Alberti de Varennes e Mendonça, pela possibilidade de me integrar no estudo preliminar no projecto de investigação PTDC/AGRO-PRO/11588/2009 intitulado “Consórcios microbiológicos da rizosfera para aumentar a eficiência do uso dos nutrientes. Uma ferramenta para sistemas de agricultura intensiva”. Agradeço-lhe por toda a atenção dedicada, em especial nos períodos mais críticos na “corrida contra o tempo” e por toda a sua compreensão face à minha limitação de tempo para dedicação aos ensaios laboratoriais.

Agradeço à Professora Catedrática Elisabeth de Almeida Duarte, pela condução deste Mestrado enquanto Coordenadora, por toda a compreensão e apoio aos alunos de regime pós-laboral, e pelas suas palavras de confiança, apesar de todos os nossos condicionalismos profissionais inerentes.

Agradeço também à Mestre Ana Lúcia Mesquita Mendes pela disponibilização dos seus dados e resultados enquanto bolseira deste projecto, e ao apoio fundamental dos Técnicos de Laboratório Paula Cristina Gonçalves da Silva e Domingos Figueiredo que colaboraram nos respectivos ensaios.

Deixo o meu especial agradecimento a toda a equipa da AGROBIO, em especial ao Jaime por toda a sua compreensão relativa ao meu estatuto de trabalhadora-estudante, bem como ao António, pelo seu constante espírito de luta e positivismo, que alento e força me proporcionaram para enfrentar as horas mais difíceis. Agradeço de igual modo à Alexandra, à Fátima e à Marta pelo companheirismo carinhoso ao longo deste percurso.

Um agradecimento muito especial às minhas queridas amigas Inês e Filipa, pela constante presença ao longo deste caminho, por todas as palavras de conforto e de extrema amizade.

Agradeço também a todos os meus amigos que me acompanharam neste período, pelo facto de compreenderem as minhas ausências em variados eventos, aos quais estive impossibilitada de comparecer, de forma a dar continuidade a este projecto.

Ao Ricardo... Porque a vida seria simplesmente mais incompleta sem ti... E porque nas horas mais sinuosas estiveste sempre lá, com todo o teu apoio, a tua imensa paciência e o teu carinho inesgotável. Do fundo do coração, obrigada!

Aos meus pais, por toda a compreensão e palavras calorosas nesta difícil etapa da minha vida. Agradeço-vos por todos os princípios e educação que desde sempre me transmitiram, bem como todo o respeito e amor incondicional! Obrigada Mãe, Obrigada Pai!

Resumo

As problemáticas ambientais resultantes do excesso de fertilização são crescentes e alarmantes, não só em Portugal, como ao nível de todo o globo terrestre.

As plantas necessitam de disponibilização de nutrientes que satisfaçam as suas necessidades metabólicas para que se possam desenvolver e, assim, alimentar a população mundial.

Os microrganismos do solo desempenham um papel fundamental nos ciclos biogeoquímicos pela sua capacidade de produção de enzimas específicas, ácidos orgânicos e outros compostos necessários para a mobilização de compostos solúveis e insolúveis, orgânicos e inorgânicos, promovendo assim a ciclagem dos nutrientes. As celuloses, fitatos, fosfatos e sulfonatos fazem parte grupo de compostos indisponíveis para a nutrição das plantas e cuja ciclagem poderá ser aumentada pela aplicação de consórcios microbianos ao solo.

Este trabalho poderá contribuir para uma agricultura mais sustentável, através da selecção de microrganismos com capacidade de mobilização de nutrientes em formas não assimiláveis pelas plantas, desempenhando um papel de biofertilizantes. Deste modo, será possível obter uma maior eficiência de uso dos fertilizantes aplicados ao solo, ou mesmo uma utilização de nutrientes já presentes no solo, reflectindo-se numa melhoria da gestão de práticas agrícolas.

Palavras-chave: Biofertilizantes, Microrganismos, Celulose, Fitato, Fosfato de Cálcio, Sulfonatos.

Abstract

There is a growing awareness about environmental impacts associated with the use of large amounts of inorganic fertilizers, not only in Portugal, but worldwide. Plants require available nutrients to meet their metabolic needs, so that they can grow appropriately and sustain an increasing global population.

Soil microorganisms play fundamental roles in biogeochemical cycles due to their ability to produce specific enzymes, organic acids and other organic compounds that are required to mobilize nutrients. These may be present in available forms, but mostly they are unavailable to plants, including many inorganic and organic, soluble or insoluble forms. Cellulose, phytates, some phosphates and sulfonates are examples of carbon, phosphorus and sulphur-containing compounds, respectively, that are not directly available to plants. Cycling of these nutrients may be enhanced by the application of microbial consortia to soils.

The present study may contribute towards a more sustainable agriculture through the selection of soil microorganisms with the capacity to mobilize nutrients which would be otherwise unavailable to plants. Such consortia can be considered as a biofertilizer. With the use of the selected microorganisms it may be possible to achieve a greater nutrient use efficiency of fertilizers applied to soils, or even of nutrients already present in soils in unavailable forms, thus contributing to better soil management practices.

Keywords: Biofertilizers, Microorganisms, Cellulose, Phytate, Calcium Phosphate, Sulfonates.

Extended abstract

Plants require available nutrients to meet their metabolic needs, so that they can grow appropriately and sustain an increasing global population. As a result, there is a growing awareness about environmental impacts associated with the use of large amounts of inorganic fertilizers, not only in Portugal, but worldwide.

The soil provides the habitat for a large number of organisms and its protection is a key-factor for the sustainability of life. Soil quality can be measured by several parameters which include its biological activity. A good activity promotes a proper use of fertilizers increasing nutrient use efficiency and avoiding excessive applications.

In biogeochemical cycles, soil microorganisms play fundamental roles due to their ability to produce specific enzymes, organic acids and other organic compounds that are required to mobilize nutrients. These may be present in available forms, but mostly they are unavailable to plants, including many inorganic and organic, soluble or insoluble forms. Cellulose, phytates, some phosphates and sulfonates are examples of carbon, phosphorus and sulphur-containing, compounds, respectively, that are not directly available to plants. Cycling of these nutrients may be enhanced by the application of microbial consortia to soils.

The present study focuses on the role of microorganisms which had the capability of degrading unavailable nutrient forms necessary for plant nutrition. It was verified that fungi were better adaptable than bacteria in the tested media. It was not possible, until the discussion of this thesis to identify the microorganisms isolated.

The results showed that cellulose is very recalcitrant and no microorganism (fungi or bacteria) grew in the plates that contained cellulose as the sole carbon source.

In the minimal media with calcium phosphate the selected microorganisms presented good growing results. This may be explained because of the initial growing phase in liquid media with calcium phosphate, which promoted the increase of microorganism capable of using this source of phosphorus. It was found that the highest phosphate ion release was proportional to the growth of fungi in liquid media. This suggests that these organisms may be of interest to be used as biofertilizers.

In the media with phytate as the sole source of phosphorus several bacteria and fungi grew well, suggesting that many microorganisms capable of using calcium phosphate are also able to mobilize phosphate from phytates.

No bacteria grew on the medium containing sulfonate as the sole sulphur source and fungi grew poorly, suggesting the need to start the isolation process already with sulfonate as the limiting compound.

The obtention of microorganisms using the approach described in this study may contribute towards a more sustainable agriculture through the selection of soil microorganisms with the capacity to mobilize nutrients which would be otherwise unavailable to plants. Such consortia can be considered as a biofertilizer. With the use of the selected microorganisms it may be possible to achieve a greater nutrient use efficiency of fertilizers applied to soils, or even of nutrients already present in soils in unavailable forms, thus contributing to better soil management practices.

Índice

Agradecimentos	ii
Resumo.....	iii
Abstract	iv
Extended abstract	v
Índice	vii
Lista de Figuras	viii
Lista de Quadros	ix
Lista de Abreviaturas	x
1. Introdução	1
1.1. <i>A Agricultura Sustentável</i>	1
1.2. <i>O Solo</i>	1
1.2.1. <i>A Problemática Ambiental da Fertilização do Solo</i>	2
1.2.2. <i>Os Microrganismos como Biofertilizantes</i>	3
1.2.3. <i>A Matéria Orgânica do Solo</i>	3
1.2.4. <i>Organismos do Solo</i>	4
1.2.4.1. <i>Bactérias</i>	7
1.2.4.2. <i>Fungos</i>	7
1.2.4.3. <i>A Actividade Enzimática no Solo</i>	8
1.3. <i>Papel dos Microrganismos nos Ciclos Biogeoquímicos</i>	9
1.3.1. <i>Carbono</i>	10
1.3.1.1. <i>Celulose (fonte de carbono usada)</i>	12
1.3.2. <i>Fósforo</i>	14
1.3.2.1. <i>Fósforo Inorgânico (Fosfato de Cálcio)</i>	16
1.3.2.1.1. <i>Fosfatases (Fosfomonoesterases)</i>	17
1.3.2.2. <i>Fósforo Orgânico (Fitato)</i>	18
1.3.2.2.1. <i>Fitases</i>	19
1.3.3. <i>Enxofre</i>	19
1.3.3.1. <i>Sulfonatos</i>	22
2. Materiais e Métodos	24
2.1. <i>Solos</i>	24
2.1.1. <i>Solo da Mina de São Domingos</i>	24
2.1.2. <i>Solo da “Terra Grande”</i>	24
2.2. <i>Colheita de Raízes e Crescimento em Meio Líquido e Sólido</i>	25
2.2.1. <i>Comparação dos fungos em meio líquido</i>	27
2.3. <i>Descrição dos Métodos Laboratoriais</i>	27
2.3.1. <i>Determinação da actividade de fosfatase</i>	27
2.3.2. <i>Doseamento dos fosfatos</i>	28
2.3.3. <i>Doseamento de sulfatos</i>	28

2.3.4.	Determinação da concentração de fósforo nos fungos (meio mínimo de fosfato de cálcio)	30
2.4.	<i>Análise Estatística dos Resultados</i>	30
3.	Resultados e Discussão	31
3.1.	<i>Bactérias</i>	31
3.2.	<i>Fungos</i>	33
4.	Conclusões	43
5.	Referências Bibliográficas	44

Lista de Figuras

Figura 1 – Estimativa de bactérias ao longo da profundidade do solo	4
Figura 2 – Esquema global dos processos de mineralização e imobilização	10
Figura 3 – Representação do Ciclo do Carbono	11
Figura 4 – Representação da cadeia alimentar.....	11
Figura 5 – Estrutura molecular da celulose	12
Figura 6 – Estrutura de Microfibrilas.....	13
Figura 7 – Estrutura hipotética dum celulosoma (<i>Clostridium thermocellum</i>)	14
Figura 8 – Ciclo do Fósforo	15
Figura 9 – Ciclo do Enxofre	21
Figura 10 – Esquema representativo da reciclagem do enxofre pelas plantas	21
Figura 11 – Estrutura representativa de um sulfonato, com evidência para a ligação carbono-enxofre (sodium 6-hydroxynaphthalene-2-sulfonate)	22
Figura 12 – Representação da Tapada da Ajuda	25
Figura 13 – Desenvolvimento dos fungos (identificados pelo respectivo número) nos meios mínimos sólidos de fitato e sulfonato	34
Figura 14 – A, B, C, D: Três repetições de cada fungo no meio mínimo líquido com fosfato de cálcio	35
Figura 15 – Primeira repetição de cada fungo (identificados pelo respectivo número) e do controlo para o meio mínimo líquido com fitato.....	35
Figura 16 – Primeira repetição de cada fungo (identificados pelo respectivo número) e do controlo para o meio mínimo líquido com fitato.....	36

Lista de Quadros

Quadro 1 – Biomassa e número aproximado de microrganismos de um solo fértil.....	5
Quadro 2 – Características do solo da Mina de S. Domingos	24
Quadro 3 – Características do solo “Terra Grande	25
Quadro 4 – Composição dos meios mínimos utilizados	26
Quadro 5 – Crescimento bacteriano em meio sólido	32
Quadro 6 – Crescimento dos cinco fungos seleccionados em meio mínimo sólido	33
Quadro 7 – Crescimento dos Fungos em Meio Líquido (g)	36
Quadro 8 – pH do meio líquido.....	37
Quadro 9 – Iões Fosfato ou Sulfato em Solução do Meio Líquido (mg P/L ou S/L)	38
Quadro 10 – Concentração de Fósforo nos Fungos com Meio Mínimo de Fosfato de Cálcio (g kg ⁻¹)	39
Quadro 11 – Fosfatase Ácida (μmol ml ⁻¹ h ⁻¹)	40
Quadro 12 – Correlações (r) entre massa do fungo e parâmetros medidos.....	42

Lista de Abreviaturas

Al – Alumínio

Al³⁺ – Ião Alumínio

As – Arsénio

BaCl₂ – Cloreto de Bário

BaSO₄ – Sulfato de Bário

C – Carbono

C₄H₄O₄ – Ácido maleico

C₆H₁₂O₆ – Glucose

C₆H₈O₇ – Ácido Cítrico

Ca – Cálcio

Ca²⁺ – Ião Cálcio

Ca₃(PO₄)₂ – Fosfato de Cálcio

CaCl₂ – Cloreto de Cálcio

CaCO₃ – Carbonato de Cálcio

CH₃COOH – Ácido Acético

CH₃COONa.3H₂O – Acetato de Sódio

CO₂ – Dióxido de Carbono

Cu – Cobre

Fe – Ferro

Fe³⁺ – Ião Ferro(III)

FeCl₃ – Cloreto de Ferro

FeSO₄ – Sulfato de Ferro

H₂O – Água

H₂PO₄⁻ – Ião Dihidrogenofosfato

H₂S – Sulfureto de Hidrogénio ou Ácido Sulfídrico

H₃BO₃ – Ácido Bórico

HCl – Ácido Clorídrico

HPO₄²⁻ – Ião Hidrogenofosfato

K – Potássio

KCl – Cloreto de Potássio

KNO₃ – Nitrato de Potássio

Mg - Magnésio

MgCl₂ – Cloreto de Magnésio

MgSO₄ – Sulfato de Magnésio

Mn – Manganês

MnCl₂ – Cloreto de Manganês

MnSO₄ – Sulfato de Manganês

N – Azoto ou Nitrogénio

Na – Sódio

Na⁺ – Ião Sódio

Na₂HPO₄ – Hidrogenofosfato de Sódio

Na₂SO₄ – Sulfato de Sódio

NaCl – Cloreto de Sódio

NaOH – Hidróxido de Sódio

NH₄NO₃ – Nitrato de Amónio

O₂ – Oxigénio molecular

OH⁻ – Ião Hidróxido

P – Fósforo

Pb – Chumbo

Pi – Fósforo Insolúvel

PO₄³⁻ – Ião Fosfato

S – Enxofre

SO₄²⁻ – Ião Sulfato

Zn – Zinco

MUB – *Modified universal buffer* (solução tampão universal modificada)

PNP – *p*-nitrofenil fosfato

NTU – *Nephelometric turbidity units* (unidades de turbidez nefelométrica)

Este estudo, inserido no projecto PTDC/AGRO-PRO/11588/2009 intitulado “Consórcios microbiológicos da rizosfera para aumentar a eficiência do uso dos nutrientes. Uma ferramenta para sistemas de agricultura intensiva.”, representa apenas alguns resultados preliminares, não tendo sido possível até ao momento de finalização desta tese a identificação dos microrganismos isolados.

Esta dissertação não foi escrita ao abrigo do novo acordo ortográfico.

1. Introdução

1.1. A Agricultura Sustentável

Como consequência do aumento populacional no planeta, o consumo alimentar tem vindo a aumentar exponencialmente ao longo das últimas décadas. A Europa Oriental e a Ásia Central sofreram o maior aumento de consumo alimentar *per capita* (24%) desde 2000, seguidas da restante Ásia, que registou um aumento de 20%. Na África sub-Saariana o consumo aumentou rapidamente entre 2000 e 2005, mas os elevados custos de produção limitaram este aumento nos últimos anos dessa década, pelo que o consumo entre o ano 2000 e o 2012 subiu apenas 11%. No caso da Europa Ocidental ocorreu uma estagnação no aumento de consumo, ao passo que na América do Norte ocorreu um declínio, o que era expectável, face ao consumos já elevados (FAO, 2012).

A agricultura mudou dramaticamente desde o fim da 2ª Guerra Mundial. A produtividade foi aumentando através de recursos tecnológicos, mecanização, fertilizantes, pesticidas, políticas agrícolas e especialização na mão-de-obra, atingindo presentemente um nível pouco sustentável. Apesar desta evolução ter apresentado muitos aspectos positivos, nomeadamente ao nível da produção, reflectiu-se em elevados custos associados, não só financeiros (aumento de custos de produção, declínio das explorações agrícolas familiares e desintegração das condições sociais e económicas das populações rurais), como ambientais, tais como a erosão dos solos, a contaminação das águas subterrâneas e a perda de biodiversidade. Desta forma, nas últimas duas décadas tem ocorrido uma crescente preocupação com as práticas agrícolas, levando à implementação do conceito de “Agricultura Sustentável”, que acenta em três grandes pilares: sustentabilidade ambiental, equidade económica e equilíbrio social, através do aproveitamento dos recursos naturalmente existentes e da inovação de técnicas da produção agrícola, através da realização de investigações científicas em variadas áreas como, por exemplo, a microbiologia, envolvendo não só a comunidade científica, como também os produtores, consumidores e comerciantes (SAREP, 2013).

1.2. O Solo

O solo representa a cobertura da Terra, consistindo num arranjo de camadas de materiais compostos por matéria orgânica e inorgânica em diferentes estados de organização (Bhoopander et al., 2005). É o maior reservatório de carbono orgânico na Terra, constituindo um habitat fundamental para uma grande diversidade de organismos (Ferreira, 2009). É o suporte base para todos os seres vivos terrestres e a sua protecção é um factor primordial para a sustentabilidade da vida neste meio (Kumar Das e Varma, 2011).

Tem uma constituição variada, cuja matriz é formada por vários materiais inorgânicos e orgânicos provenientes de resíduos de plantas, biomassa microbiana e animal, e diversas substâncias com diferentes graus de decomposição ou sintetizadas de novo. Devido a esta alargada composição, o

solo confere condições favoráveis para uma diversa comunidade de seres vivos, desde os macro aos microrganismos, cuja actividade é condicionada pelas condições oferecidas pelo meio, em especial no que toca às suas propriedades físicas e químicas. Tem, por tal, uma relação estreita com estes organismos, dado que alguns deles contribuem directamente para o aumento da sua fertilidade, através de processos como a fixação de azoto atmosférico ou a mobilização de alguns compostos insolúveis. A maioria dos organismos são saprófitas e de vida livre, desempenhando um papel fundamental na ciclagem de nutrientes, através de processos de decomposição e mineralização de resíduos orgânicos (Ferreira e Sousa, 1998).

A saúde do solo resulta dum correcto balanço entre as actividades físicas, químicas e biológicas (onde se inclui a actividade microbiana) deste meio, e está dependente do equilíbrio entre a sua degradação e conservação, que poderão ser avaliadas através de vários factores, como sendo o crescimento das plantas, a qualidade da água e a actividade biológica. É essencial para a integridade dos ecossistemas terrestres no que toca à adaptação às alterações climáticas, poluição, degradação provocada pela actividade humana (como algumas práticas agrícolas), condições de seca e encharcamento, e infestação de pragas. Influencia todo o equilíbrio do meio ambiente, bem como a saúde das plantas e a consequente qualidade dos alimentos (Kumar Das e Varma, 2011).

A microbiologia do solo emergiu como um ramo da ciência em 1893, depois do químico e agricultor francês Boussingault demonstrar que as plantas tinham a capacidade de obter azoto a partir da atmosfera. Cinco anos depois, o cientista alemão Beijerinck, isolou as bactérias existentes nos nódulos das raízes das leguminosas. A partir daí, uma série de estudos foram levados a cabo na área da microbiologia do solo. No entanto, e face à sua variedade e complexidade, esta é ainda uma área com muito por descobrir (Bhoopander et al., 2005).

O interesse pela diversidade microbiana do solo desenvolveu-se rapidamente na comunidade científica. Isto ocorreu dada a importância destes seres ao nível da fertilidade do solo, que depende, não só da sua composição química, como também da natureza qualitativa e quantitativa dos microrganismos que o habitam (Bhoopander et al., 2005).

Assim, a manutenção da diversidade da população microbiana funcional no solo é essencial para uma agricultura sustentável.

1.2.1. A Problemática Ambiental da Fertilização do Solo

Os fertilizantes químicos, tal como os pesticidas, são um dos principais problemas ambientais quando mal utilizados, que se reflectem em todos os ecossistemas aos quais se somam os impactos económicos resultantes da utilização destes produtos (Gyaneshwar et al., 2002).

1.2.2. Os Microrganismos como Biofertilizantes

A utilização de biofertilizantes na agricultura, sob a forma de microrganismos com capacidade de mobilização de nutrientes presentes em formas não assimiláveis pelas plantas, pode reflectir-se num aumento da disponibilidade destes, promovendo o crescimento vegetal mas também numa menor necessidade de fertilização, levando a menores custos associados a este processo (Gyaneshwar et al., 2002).

O grande interesse de utilização de microrganismos como biofertilizantes existe especialmente em zonas com disponibilidade de nutrientes abaixo dos limites necessários para as culturas, onde estes se encontrem sob formas indisponíveis, ou como método de reduzir as aplicações de fertilizantes minerais, aumentando a eficiência de uso dos nutrientes já presentes no solo ou aplicados sob formas orgânicas ou inorgânicas insolúveis (Tripura et al., 2005).

Grande parte das vantagens da utilização de microrganismos como biofertilizantes tem sido avaliada a partir dos estudos relativos à actividade do rizóbio nas leguminosas, no processo da fixação do azoto onde ocorrem processos simbióticos (Gyaneshwar et al., 2002).

A **inoculação** é um recurso à colmatação destas necessidades. Neste processo ocorre uma incorporação de organismos benéficos ao solo e às culturas, que irá desencadear competição com a população microbiana já existente, levando a que a taxa de sucesso da inoculação possa ser reduzida. O inóculo comercializado em maior quantidade diz respeito ao rizóbio para leguminosas, de modo a aumentar a quantidade de azoto fixado a partir da atmosfera (Plaster, 2008).

Para que o processo de inoculação tenha maior viabilidade devem-se melhorar as condições do solo para esse fim. A incorporação de matéria orgânica, proveniente de resíduos vegetais e animais, é um factor essencial ao desenvolvimento dos microrganismos do solo, podendo ser decisivo no sucesso desta operação (Plaster, 2008).

Os factores bióticos que afectam a sobrevivência dos microrganismos inoculados incluem a sua sobrevivência ao meio, competição entre estes e os do solo, predação e desenvolvimento das raízes e da sua libertação de exudados, que são a fonte alimentar destes seres. Os abióticos incluem textura, pH, temperatura, humidade e disponibilidade de substratos no solo (Gyaneshwar et al., 2002).

1.2.3. A Matéria Orgânica do Solo

A matéria orgânica não viva do solo tem como o húmus a sua principal constituição. Este resulta da alteração de resíduos e fertilizantes de origem animal e vegetal. Este processo é mediado por organismos do solo, onde parte sofre **mineralização**, transformando-se em nutrientes solúveis (azoto, fósforo, enxofre, entre outros) disponíveis para a alimentação das plantas, e o restante sofre transformação, ou seja, é sujeito a alterações e síntese de novas moléculas, processo que no seu conjunto é designado por **humificação** e que leva à formação de húmus (Ferreira, 2009).

O húmus tem características muito importantes para a produção agrícola, influenciando a fertilidade do solo, bem como as suas características físicas, químicas e biológicas, e representa o componente mais estável da matéria orgânica, sujeita a uma mineralização muito mais lenta do que os restantes compostos orgânicos (Ferreira, 2009).

1.2.4. Organismos do Solo

“Um solo fértil é um mundo vivo com milhões de organismos por cada grama de terra, numa quantidade que pode chegar a várias toneladas por hectare” (Ferreira, 2009). Na camada superficial do solo (cerca dos primeiros 30 cm de profundidade) concentra-se uma massiva quantidade de seres vivos, estimando-se que representem 80% do total do planeta (Ferreira, 2009), como representado na figura 1, exemplificando o caso das bactérias.

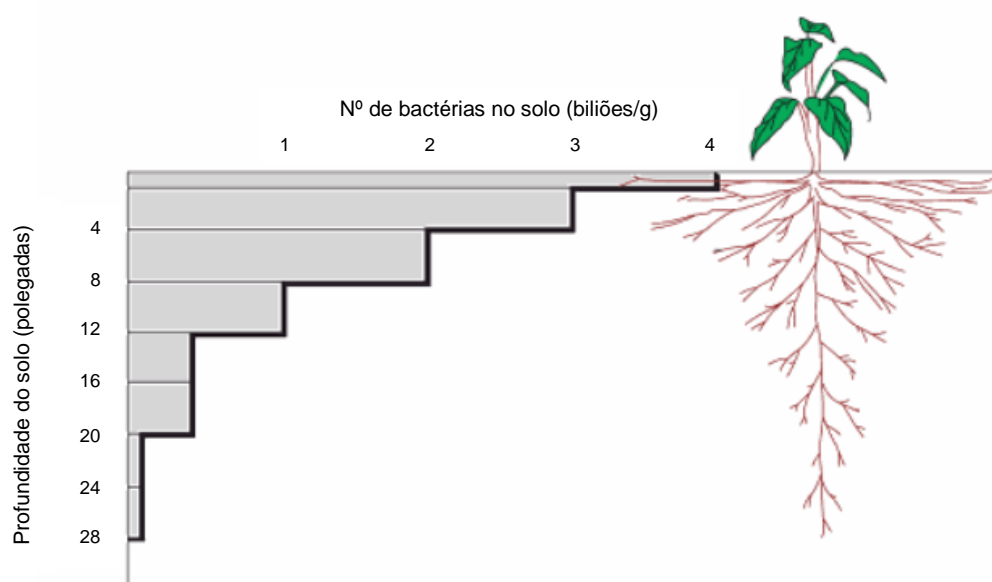


Figura 1 – Estimativa de bactérias ao longo da profundidade do solo
(Fonte: Plaster, 2008)

A qualidade do solo pode medir-se pela sua actividade biológica, nomeadamente pelos organismos que lhe são benéficos. Uma boa actividade promove uma correcta utilização dos recursos fertilizantes, adequados às necessidades culturais, evitando uma excessiva aplicação dos mesmos (Ferreira, 2009).

A população microbiana neste habitat é sensível às condições do meio, nomeadamente no que respeita à temperatura, humidade, teor de oxigénio, pH e nutrientes, condições estas que poderão ser manipuladas pelas práticas agrícolas (Plaster, 2008). Os microrganismos têm rápida capacidade de resposta às variações das condições ambientais e às alterações físicas e químicas do solo, representando um excelente indicador da qualidade deste meio (Kumar Das e Varma, 2011).

A baixas temperaturas diminui a actividade biológica, afectando o processo de mineralização. Em termos de pH, a maioria dos microrganismos tem preferência por valores neutros, havendo uma maior tolerância por parte dos fungos aos solos ácidos e dos actinomicetas aos alcalinos (Plaster, 2008). No quadro 1, expressam-se os números aproximados da biomassa e número de microrganismos de um solo fértil (Ferreira e Sousa, 1998).

Quadro 1 – Biomassa e número aproximado de microrganismos de um solo fértil

Organismos	Números/g solo	Biomassa (kg/ha)
Bactérias	10^8 - 10^9	300-3000
Actinomicetas	10^7 - 10^8	300-3000
Fungos	10^5 - 10^6	500-5000
Microalgas	10^3 - 10^6	10-1500
Protozoários	10^3 - 10^5	5-200

(Fonte: Ferreira, 1998)

Muito pouco é ainda conhecido sobre os ecossistemas do solo, estimando-se que apenas cerca de 1% dos seus microrganismos tenham sido identificados (Ferreira e Sousa, 1998). Estes podem ser classificados em três grupos principais, dependendo do seu tamanho: **macrofauna** – animais de maior dimensão, facilmente visíveis a olho nu, como por exemplo as minhocas; **mesofauna** – animais multicelulares de pequena dimensão, como o caso de alguns insectos; e **microrganismos** (microfauna e microflora): **microfauna** – organismos microscópicos considerados animais unicelulares, denominados por protozoários; **microflora** - organismos microscópicos como sendo, bactérias, fungos, e algas. Cada uma destas categorias desempenha um papel específico e fundamental ao nível da cadeia alimentar e da ciclagem dos nutrientes (Plaster, 2008). Através da sua diversidade metabólica, desempenham um papel decompositor da matéria orgânica, essencial ao equilíbrio do ecossistema, bem como ao nível de variados processos catalíticos que ocorrem na natureza, integrando os variados ciclos, como sendo o do carbono, do azoto, do enxofre e do fósforo (Tripura et al., 2005).

Os organismos do solo necessitam de água e recursos alimentares para o seu desenvolvimento. Essas condições são mais favoráveis nos horizontes superficiais, dado que essas são as zonas onde a estrutura do solo é mais favorável, e com maior quantidade de oxigénio, água e nutrientes (Plaster, 2008).

Na **rizosfera**, zona envolvente das raízes que em condições normais apresenta uma maior concentração microbiana relativamente ao resto do solo, encontram-se principalmente bactérias, bem como fungos, protozoários e nemátodos (Ferreira, 2009). Tal ocorre devido à presença de um elevado teor de matéria orgânica, constituída por células mortas e exsudados radiculares produzidos pelas células epidérmicas, ricos em polissacáridos, aminoácidos, hormonas e vitaminas, que promovem o crescimento microbiano (Ferreira e Sousa, 1998). Estas substâncias são exsudadas,

excretadas ou destacadas numa quantidade total que pode alcançar os 40% do carbono fixado pela fotossíntese, constituindo por isso uma importante fonte alimentar (Ferreira, 2009).

Esta zona contém geralmente menor concentração de nutrientes como nitratos e fosfatos comparativamente ao restante solo, uma vez que ocorre uma competição entre plantas e microrganismos por estes. À semelhança dos fosfatos, a região que rodeia imediatamente a raiz é caracterizada por uma zona empobrecida em sulfatos, que pode alcançar vários milímetros de largura. Isto potencia a decomposição de fontes orgânicas de enxofre, como os sulfonatos, por bactérias específicas, sendo que estas poderão utilizar sulfonatos alifáticos e aromáticos como fonte de carbono, azoto ou de energia (Schmalenberger e Kertesz, 2007).

Em suma, a rizosfera desempenha funções de elevada importância para as plantas:

1. Mineralização da matéria orgânica, fornecendo um elevado conjunto de nutrientes às plantas;
2. Diminuição do potencial de oxidação-redução, beneficiando a absorção de nutrientes de carga positiva (como o caso do ferro);
3. Produção de factores de crescimento, como sendo hormonas de crescimento vegetal;
4. Produção de agentes quelatantes (sideróforos - proteínas de baixo peso molecular produzidas pelas bactérias ou pelas plantas, com grande afinidade para vários cationes metálicos, formando quelatos de ferro, manganês, zinco, etc);
5. Produção de factores contra pragas e doenças (antibióticos, enzimas, etc.);
6. Impedimento do desenvolvimento de doenças do solo junto das raízes (Bridge e Spooner, 2001).

Devido a esta interacção benéfica, a associação entre as raízes das plantas e a comunidade microbiana pode influenciar a química do solo, incluindo o pH e as transformações ao nível do azoto, fósforo e enxofre (Bridge e Spooner, 2001).

Os microrganismos do solo são um dos indicadores da sua fertilidade, podendo ser classificados em função de:

1. *Respiração*: **aeróbios**, caso utilizem oxigénio para os processos oxidativos dos compostos orgânicos, ou **anaeróbios**, se utilizarem outros receptores de electrões que não o oxigénio;
2. *Alimentação*: **produtores** ou **autotróficos**, com capacidade de utilizar fontes inorgânicas de carbono, (alguns microrganismos); **consumidores** ou **heterotróficos**, que podem ser classificados como **primários** quando se alimentam de plantas, **secundários** quando a sua fonte alimentar são os consumidores primários, e por aí diante; e **decompositores** ou **saprófitas**, como sendo os microrganismos que decompõem a matéria orgânica não viva. Além destes, existem também os microrganismos **parasitas**, que são os responsáveis por doenças, os seus respectivos **predadores**, e os **simbióticos** que promovem relações mutualistas com as plantas (Plaster, 2008).

Nesta revisão bibliográfica, adaptada ao caso de estudo em questão, irão ser abordadas apenas as bactérias e os fungos por serem os microrganismos melhor caracterizados em relação à mobilização de fósforo e enxofre.

1.2.4.1. Bactérias

As bactérias são os organismos unicelulares (procariontes) mais abundantes no solo, sendo maioritariamente aeróbias heterotróficas. As restantes obtêm energia autotroficamente através das reacções químicas com alguns compostos existentes no solo. Grande parte das bactérias existentes no solo são saprófitas, desempenhando funções decompositoras da matéria orgânica (Plaster, 2008).

Os géneros mais comuns heterotróficos são *Bacillus*, *Clostridium*, *Arthrobacter*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Azotobacter* e *Nitrobacter*. As bactérias pertencentes a grupos fisiológicos específicos, como sendo as bactérias nitrificantes, as fixadoras de N₂, as oxidantes de enxofre ou as redutoras de sulfatos, constituem, no geral, apenas uma pequena parte da comunidade bacteriana (Ferreira e Sousa, 1998).

As bactérias têm um papel particularmente importante ao nível do solo, dada a sua abundância e diversidade metabólica, desempenhando importantes funções como sendo:

1. Processos de decomposição da matéria orgânica (aeróbias heterotróficas);
2. Transformação dos compostos azotados, como amónio em nitrato, nitrato em nitrito, etc. (aeróbias e/ou anaeróbias autotróficas);
3. Fixação de azoto da atmosfera, através de processos de simbiose com as raízes das plantas de leguminosas (*Rhizobium spp.*), ou através das cianobactérias *Anabaena spp.*, ou mesmo sob a sua forma livre como o *Clostridium spp.* e *Azotobacter spp.* (semi-autotróficas);
4. Competição com organismos patogénicos das culturas (Ferreira, 2009).

1.2.4.2. Fungos

Os fungos (organismos eucariontes) são os microrganismos que geralmente predominam, não em número, mas em biomassa, entre os microrganismos do solo. Desempenham funções várias e distintas, como sendo processos de simbiose com as plantas, patogénicos para o reino vegetal e animal, ou de decomposição da matéria orgânica do solo (Ferreira e Sousa, 1998).

Os géneros de fungos mais comuns ao nível do solo são o *Penicillium*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Fusarium*, *Cladosporium*, *Aspergillus* e *Trichoderma* (Ferreira e Sousa, 1998).

Os fungos são um grupo de organismos muito diverso, podendo abranger seres vivos de variadas formas, desde seres unicelulares, como o caso das leveduras, até macrorganismos, como os cogumelos.

Estudos realizados levam a crer que a grande maioria das espécies de fungos tem parte do seu ciclo de vida associado ao solo, sendo que o papel destes organismos é fundamental para este ecossistema. É, no entanto, de extrema dificuldade determinar o número de fungos existentes, dadas as limitações nas técnicas analíticas actuais (Bridge e Spooner, 2001).

Para o desenvolvimento e crescimento do micélio, os fungos utilizam a matéria orgânica do solo como fonte nutritiva (Ferreira e Sousa, 1998).

Alguns fungos desenvolvem ainda uma importante simbiose com as plantas dando origem às **micorrizas**, que se podem dividir em endo e ectomicorrizas. Esta simbiose entre a raiz e o fungo está muito disseminada, pelo que se estima que cerca de 80% das plantas terrestres apresentem este tipo de processo. Neste, a planta beneficia dos minerais e água do solo que são cedidos pelo fungo, enquanto que, por sua vez, o fungo irá beneficiar do carbono orgânico que a planta fornece (Ferreira e Sousa, 1998).

Nas ectomicorrizas desenvolve-se um manto de fungos em torno das raízes das plantas, com a penetração intercelular ao nível do córtex da raiz, originando a *rede de Hartig*, permitindo uma maior área de contacto entre a planta hospedeira e o fungo. As hifas formadas pelo fungo têm a capacidade de se estenderem até largas distâncias, promovendo o transporte de solutos até à planta hospedeira, que as suas raízes não alcançariam (Ferreira e Sousa, 1998).

Dada a necessidade de inóculos de fácil produção, os fungos micorrízicos, não sendo cultiváveis em meios mínimos, não foram utilizados nos ensaios deste estudo.

Em suma, os fungos intervêm sobretudo em:

1. Degradação da celulose e da lenhina dos resíduos vegetais, que podem ser ponto de partida para a formação do húmus;
2. Degradação das matérias orgânicas azotadas (como por exemplo os existentes em estrumes e chorumes) com formação de ião amónio (amonificação) que pode ser absorvido pelas plantas ou transformado pelas bactérias nitrificantes em nitritos e nitratos;
3. Controlo de inimigos das culturas, como o caso de certos nemátodos e insectos;
4. Formação de micorrizas (Ferreira, 2009).

1.2.4.3. A Actividade Enzimática no Solo

As enzimas são proteínas com capacidade catalítica, sendo específicas para uma determinada reacção. Esta especificidade é determinada pela sua natureza, cuja complexidade estrutural providencia as condições adequadas à ocorrência dessa reacção, permitindo o reconhecimento de um determinado substrato ou grupo de substratos. As enzimas ligam-se ao substrato nas zonas denominadas por “centro activo”, cuja conformação se mantém definida em condições ambientais específicas. Variações extremas nestas condições (como na temperatura e no pH) levam a uma

alteração na conformação enzimática, provocando a sua desnaturação (na maioria das vezes irreversível) e resultando na perda da sua actividade catalizadora (Ferreira e Sousa, 1998).

As enzimas são activadoras vitais nos processos dos seres vivos, desempenhando um papel ecológico na ciclagem da matéria orgânica e nutrientes, traduzindo-se num aumento da fertilidade do solo (Kumar Das e Varma, 2011).

A actividade enzimática existente ao nível do solo é principalmente de origem microbiana, podendo ter proveniência de enzimas intra ou extra-celulares, e é dependente de factores como a quantidade e tipo de matéria orgânica existente, a actividade dos organismos vivos e a intensidade dos seus processos biológicos, bem como da própria composição do solo (Kumar Das e Varma, 2011).

Por envolverem processos simples e rápidos, e estarem estritamente relacionadas com a matéria orgânica, com as propriedades físico-químicas do solo e com a actividade microbiana, as enzimas do solo funcionam como indicadores de potenciais alterações ecológicas e de qualidade neste meio (Kumar Das e Varma, 2011).

Existem variadas enzimas ao nível do solo, nomeadamente amilases, proteases, quitinases e ureases, entre outras (Kumar Das e Varma, 2011), destacando-se para este caso as fosfatases que serão objectos de estudo neste trabalho.

A actividade enzimática representa assim um importante auxiliar na agricultura, potenciando uma maior rentabilidade dos nutrientes existentes no solo, bem como os que a este forem adicionados sob formas orgânicas.

1.3. Papel dos Microrganismos nos Ciclos Biogeoquímicos

Os organismos do solo são responsáveis através do seu próprio metabolismo, de forma directa ou indirecta, por alterações de onde pode resultar a oxidação de compostos orgânicos que se encontravam anteriormente indisponíveis para absorção pelas plantas (Ferreira, 1998).

A ciclagem dos nutrientes consiste na alternância entre a **mineralização** (Plaster, 2008), que consiste no processo de conversão de formas orgânicas em minerais, e a **imobilização**, relativa à utilização dos nutrientes em formas minerais pelos organismos e a sua conversão em formas orgânicas (Varennnes, 2003), tal como ilustrado na figura 2.



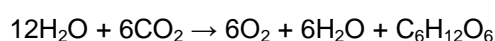
Figura 2 – Esquema global dos processos de mineralização e imobilização
(Fonte: Plaster, 2008)

Para este caso de estudo, é importante a abordagem dos ciclos do carbono, fósforo e enxofre, dado que são os elementos constituintes dos compostos de estudo (celulose, fitato, fosfato de cálcio e sulfonatos).

1.3.1. Carbono

Todos os solos têm carbono (constituente da matéria orgânica) em quantidades variáveis (Ferreira e Sousa, 1998).

O carbono tem como maior fonte de reserva o CO_2 presente na atmosfera. Através da captação do CO_2 na fotossíntese realizada pelas plantas obtém-se hidratos de carbono como a glucose, segundo a reacção química (Ferreira e Sousa, 1998):



Nas plantas, e por meio da fotossíntese e da respiração, o carbono passa de sua fase inorgânica à fase orgânica e volta à fase inorgânica, completando o seu ciclo (Ferreira e Sousa, 1998).

O ciclo do carbono inclui transformações biogeoquímicas dos compostos carbonados, representando uma sequência cíclica de reacções (Ferreira e Sousa, 1998), como demonstrado na figura 3.

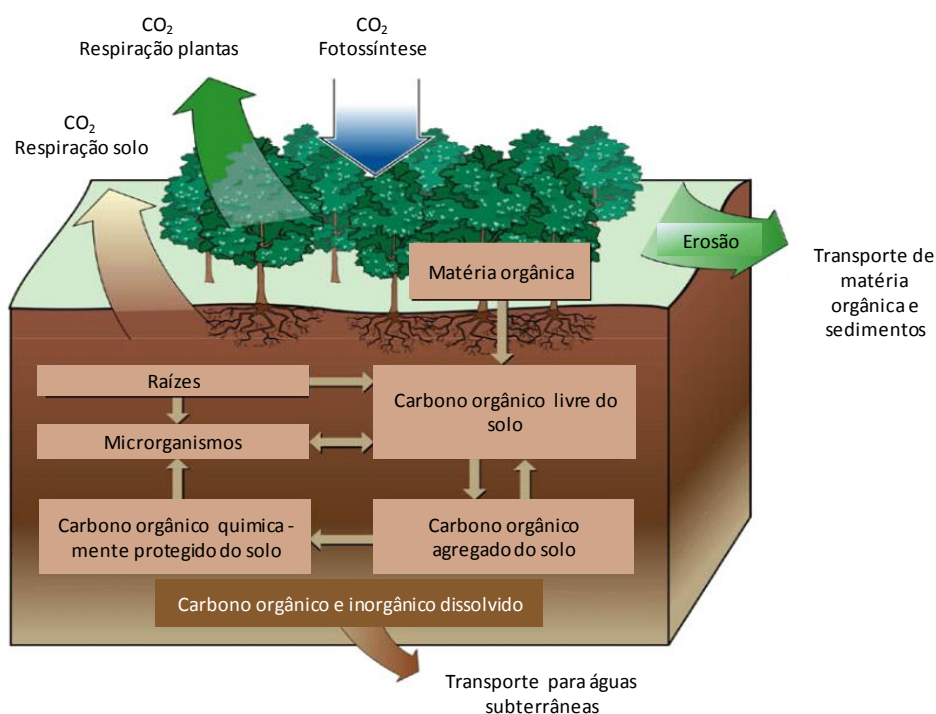


Figura 3 – Representação do ciclo do carbono

(Fonte: http://www.tececo.com/sustainability.role_soil_sequestration.php?print)

A cadeia alimentar inclui a ciclagem do carbono e energia na natureza, que resulta da interação de todos os organismos vivos, onde cada um desempenha um papel específico no ciclo (figura 4).

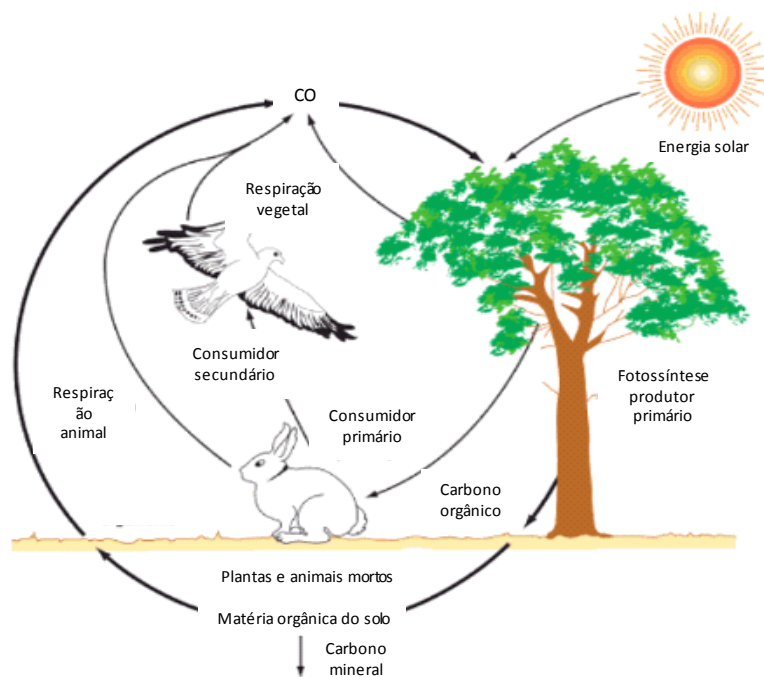


Figura 4 – Representação da cadeia alimentar

(Fonte: Plaster, 2008)

Sem a acção destes organismos haveria um colapso na ciclagem do carbono, uma vez que ficaria fixado nos seres mortos, não permitindo a sua reintegração em novos processos, como por exemplo o retorno à atmosfera sob a forma de dióxido de carbono, resultante da respiração microbiana (Plaster, 2008).

1.3.1.1. Celulose (fonte de carbono usada)

A biomassa vegetal contém uma variedade de polissacáridos que desempenham funções estruturais e de reserva. A celulose e a hemicelulose são proeminentes, cuja quantidade e disponibilidade fazem das plantas uma fonte de energia renovável e que, devido à sua origem a partir de processos fotossintéticos, é indirectamente um produto da energia solar (Santos et al., 2002).

Cerca de metade dos compostos de carbono existentes na biomassa terrestre encontra-se sob a forma de celulose, pelo que a hidrólise deste polissacárido representa um dos mais importantes processos enzimáticos da natureza (Santos et al., 2002).

A celulose (cadeias de β -glucose que podem atingir as 10000 unidades) é o polímero orgânico mais abundante nas plantas, resultando no polissacárido renovável mais abundante ao nível da biosfera. É um material resistente, idealmente adequado para assegurar a estabilidade estrutural de plantas terrestres, sendo o componente principal da parede celular primária (Santos et al., 2002).

As moléculas de celulose (figura 5) são organizadas em unidades denominadas microfibrilas (figura 6), que correspondem a cadeias não ramificadas de glucose ligadas entre si por ligações β_{1-4} . Estas cadeias são constituídas por um número variável de resíduos de celobiose que se vão repetindo ao longo da molécula, com um comprimento médio por molécula de cerca de 8000 resíduos. O centro de cada microfibrila é constituído por moléculas de celulose dispostas numa perfeita disposição tridimensional, formando uma região cristalina, sendo esta a de mais difícil biodegradação. A região que rodeia o centro cristalino, denominada por paracristalina, é de igual modo constituída por moléculas de celulose paralelas às do centro, mas sem apresentar a referida conformação perfeita (Santos et al., 2002).

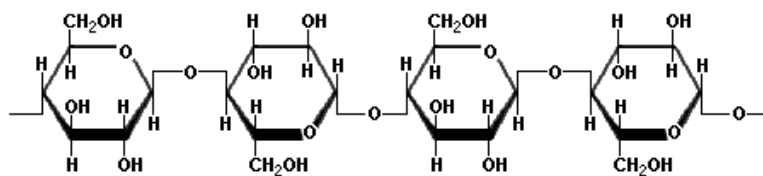


Figura 5 – Estrutura molecular da celulose

(Fonte: <http://www.scientificpsychic.com>)

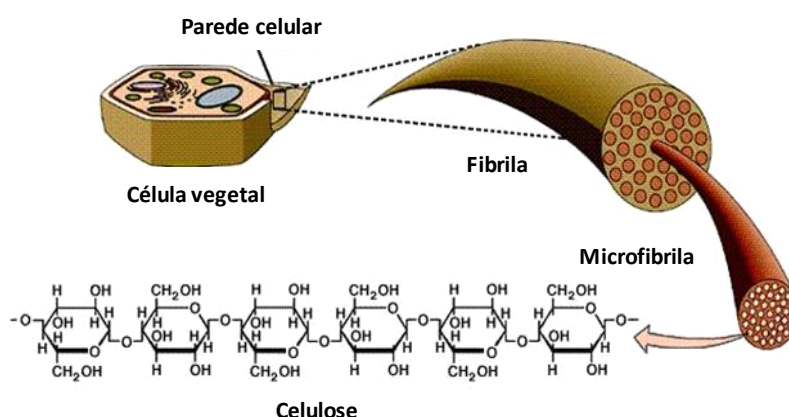


Figura 6 – Estrutura de microfibrilas

(Fonte: <http://www.mhhe.com>)

Apesar da celulose cristalina ter uma composição homogênea, não é conhecida nenhuma enzima capaz de a degradar completamente, dado que a extensa área de superfície da microfibrila insolúvel é um substrato extraordinariamente resistente à hidrólise enzimática (Schwarz, 2001). A celulose é, por tal, de natureza recalcitrante, limitando a sua utilização energética. Deste modo, a sua hidrólise é complexa, em especial nas zonas cristalinas (Santos et al., 2002), sendo necessário recorrer a acções sinérgicas multienzimáticas (Vodovnik e Logar, 2010), nomeadamente celulasas (enzimas responsáveis pela catálise da celulose, convertendo-a em glúcidos mais simples) (Edward, 1998) e hemicelulasas, para proceder a esse processo (Vodovnik e Logar, 2010).

Os microrganismos desempenham um papel essencial neste processo. Os aeróbios produzem e libertam elevadas concentrações de enzimas extracelulares de acção sinérgica com capacidade de ligação a vários substratos. Os anaeróbios desenvolveram um mecanismo energeticamente mais rentável para a degradação da celulose, os **celulossomas**, definidos como estruturas macromoleculares (Bayer et al., 2008), que consistem num complexo polipeptídico (hidrolases da parede celular) de produção de complexos multienzimáticos extracelulares, combinando domínios catalíticos (hidrolases) ligados a um ou mais domínios não catalíticos (hidratos de carbono), sendo denominada por ligação “CBM” (do inglês Carbohydrate Binding Modules) (figura 7). Os “CBM” têm a capacidade de direccionar os módulos enzimáticos para os seus substratos, prolongando a interacção entre a enzima e o polissacárido. Apesar dos celulossomas apresentarem uma estrutura categorizada como universal, entre os microrganismos poderão existir diferenças entre o número e a conformação dos seus componentes (Vodovnik e Logar, 2010).

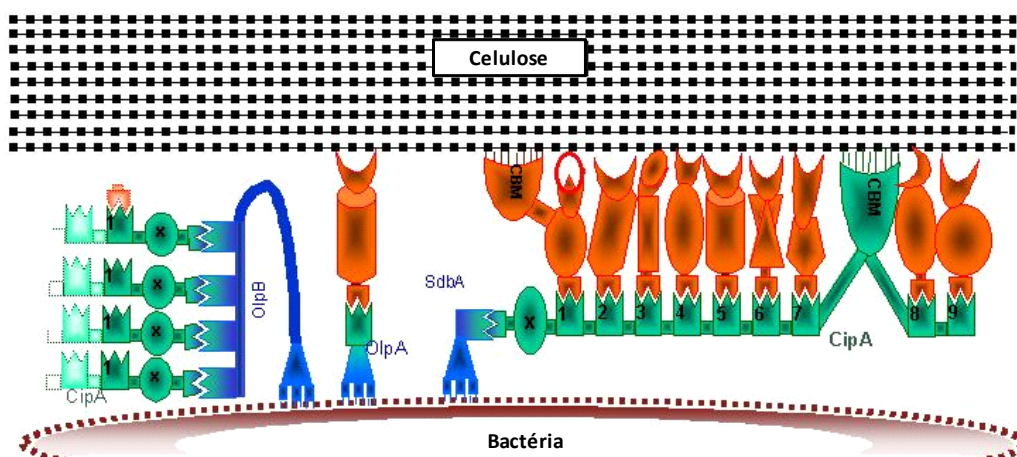


Figura 7 – Estrutura hipotética dum celulosoma (*Clostridium thermocellum*)

(Fonte: <http://www.wzw.tum.de/mbiotec/celostruct.htm>)

De um modo geral, pensa-se que as enzimas fúngicas funcionam de formas distintas: as endoglucanases têm um papel activo ao nível interno nas cadeias de celulose de forma aleatória, promovendo a quebra das moléculas em cadeias mais pequenas; as exoglucanases actuam nas extremidades das cadeias, potenciando a libertação de resíduos de celobiose; e as β -glucosidases hidrolisam as ligações entre os dois resíduos de glucose presentes em cada molécula de celobiose. Este modo é, no entanto, um modo simplista de visualizar as reacções enzimáticas já que se sabe que elas actuam sinergicamente e, em determinadas condições, podem actuar de forma diferente (ex: exoglucanases actuarem como endoglucanases) (Santos et al., 2002).

A actividade das celulasas nos solos é afectada por diversos factores, incluindo a temperatura, o pH do solo, a disponibilidade de água e oxigénio, a estrutura química e qualidade da matéria orgânica e a sua localização nos horizontes do solo, os resíduos vegetais, os minerais do solo e a poluição deste meio (nomeadamente a quantidade e qualidade de pesticidas presentes) (Kumar Das e Varma, 2011).

1.3.2. Fósforo

O ciclo do fósforo (figura 8) é um sistema dinâmico que envolve o solo, as plantas e os microrganismos (Varenes, 2003).

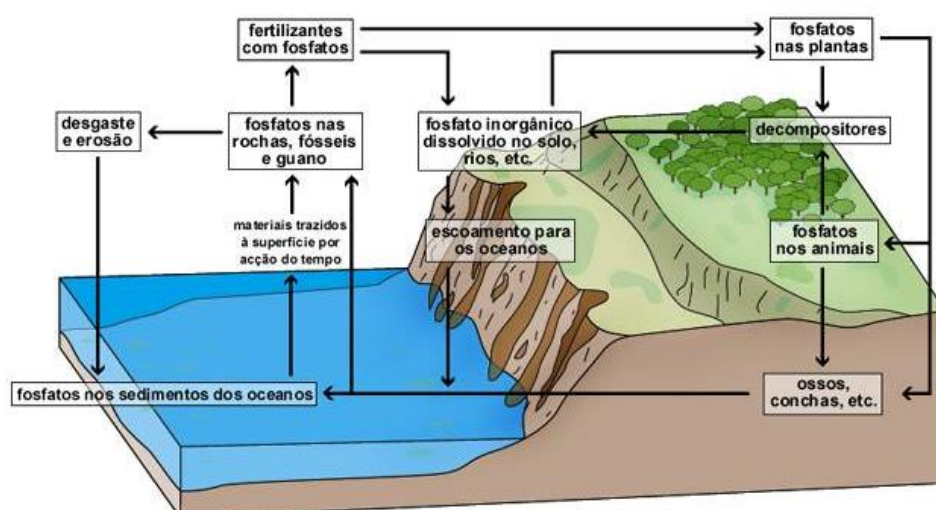


Figura 8 – Ciclo do Fósforo
(Fonte: [http://www.infopedia.pt/\\$ciclo-do-fosforo,2](http://www.infopedia.pt/$ciclo-do-fosforo,2))

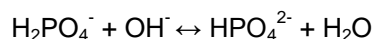
À semelhança do azoto, o fósforo é um macronutriente essencial para o crescimento e metabolismo dos seres vivos (Varenes, 2003). Existe em elevada concentração ao nível dos frutos e sementes, sendo necessário para a formação e germinação das últimas (Varenes, 2003), e está envolvido em variados processos, nomeadamente: fotossíntese, divisão celular, processos oxidativos, transferências de energia e nutrientes (Tripura et al., 2005), formação de ATP, estruturas do DNA, RNA e fosfolípidos (Bhoopander et al., 2005), síntese de hidratos de carbono (entre eles o principal transportado no floema, essencial para o desenvolvimento da planta - a sacarose), e em importantes funções ao nível de tolerância a doenças. A sua carência reduz o vingamento, o crescimento e a maturação dos frutos e sementes, resultando em grandes perdas de produção (Tripura et al., 2005).

Tem também um papel essencial ao nível do rizóbio, uma vez que estimula o desenvolvimento dos nódulos e promove um bom desempenho das bactérias fixadoras de azoto (Varenes, 2003).

É, juntamente com o azoto, dos nutrientes que maior défice apresenta ao nível dos solos (Varenes, 2003), estando disponível apenas em quantidades micromolares na solução do solo, enquanto que a maioria dos nutrientes existe em quantidades milimolares (Gyaneshwar et al., 2002).

O fósforo está maioritariamente presente no solo em formas insolúveis ou de baixa solubilidade, o que representa uma limitação ao nível da nutrição das plantas (Varenes, 2003). Para compensar esta deficiência, são adicionados ao solo iões fosfato sob a forma de fertilizantes minerais, mas a eficiência de utilização é reduzida, uma vez que forma compostos insolúveis com os constituintes do solo, como por exemplo fosfatos de cálcio, ferro e alumínio, ou é adsorvido na sua matriz. Isto leva a uma aplicação excessiva de fósforo ao solo, de forma a permitir que a assimilação de fósforo solúvel seja suficiente para satisfazer as necessidades culturais (Vassilev e Vassileva, 2003). Embora pouco móvel no solo, pode sofrer perdas por volatilização e lixiviação (Correia, 1980), onde da última poderá resultar na eutrofização das águas superficiais (Vassilev e Vassileva, 2003).

O fósforo é absorvido na forma de ião dihidrogenofosfato (H_2PO_4^-), e mais lentamente na forma de ião hidrogenofosfato (HPO_4^{2-}), sendo que a proporção das duas espécies na solução do solo vai depender do pH (Illmer e Schinne, 1995):



Como apenas estes iões são absorvidos em quantidades apreciáveis, o fósforo inorgânico livre na solução do solo desempenha um papel central na ciclagem de fósforo e na nutrição das plantas (Illmer e Schinne, 1995).

Em solos cujo pH é inferior a 6,0 predomina o H_2PO_4^- e, em solos alcalinos, o HPO_4^{2-} . Nos solos alcalinos é frequente a deficiência de fósforo, dado que o HPO_4^{2-} é menos solúvel e tem uma absorção mais lenta. De facto, em solos com elevada alcalinidade ou acidez, o fósforo tende a insolubilizar (Ferreira, 2009), levando a que apenas uma concentração muito baixa fique disponível para as plantas. Esta retenção pode estar associada à sua elevada reactividade com alguns metais, tais como Fe, Al, e Ca, que potenciam a sua precipitação ou adsorção (Adesemoye e Kloepper, 2009).

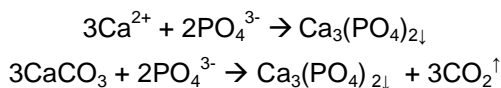
Uma pequena parte do fósforo encontra-se associada ao húmus (cerca de 0,5% do total), pelo que a sua mineralização anual promove uma ligeira libertação, estando dependente do teor de matéria orgânica humificada do solo e da taxa de mineralização (Ferreira, 2009).

1.3.2.1. *Fósforo Inorgânico (Fosfato de Cálcio)*

No solo, os iões fosfato (aniões) podem ser imobilizados através da precipitação com Ca^{2+} , Fe^{3+} e Al^{3+} , formando compostos insolúveis e indisponíveis para as plantas (Oliveira et al., 2009). Os fosfatos podem também ser adsorvidos por troca de ligando, em particular a óxidos e hidróxidos de ferro, alumínio ou manganês. Este processo é por vezes denominado por fixação ou retenção de fosfato. Esta fracção pode ser utilizada pelas plantas, através da mediação de microrganismos solubilizadores de fosfato, muitos deles identificados na rizosfera (Stevenson e Cole, 1999). Estes microrganismos promovem mecanismos de solubilização pela libertação de ácidos orgânicos ou protões no meio. Os ácidos orgânicos secretados podem trocar com o P adsorvido ou formar quelatos com os compostos de Fe ou de Al associados ao fósforo (Gyaneshwar et al., 2002).

Na presença de fosfato pode ainda dar-se uma adsorção ao nível dos colóides do solo, com catiões a formar uma ponte de ligação, fenómeno este designado por **coadsorção**. Com este processo o fosfato fica disponível para as plantas (Stevenson e Cole, 1999).

Em condições de alcalinidade pode ocorrer uma elevada concentração de iões Ca^{2+} , bem como de CaCO_3 . O fosfato tem a capacidade de reagir com ambas as formas, segundo as seguintes reacções, originando fosfato tricálcico insolúvel (Stevenson e Cole, 1999):



Grande parte do fósforo aplicado sob a forma de fertilizantes sofre rápidos processos de adsorção e precipitação, levando a uma elevada insolubilização (Yadav e Tarafdar, 2003). A explicação para a solubilização do fósforo inorgânico não é uniforme no mundo científico. Enquanto uns consideram que está associada à libertação de ácidos orgânicos por parte de microrganismos e plantas, outros defendem que, pelo facto de não ter sido descoberta uma ligação entre a quantidade de ácidos orgânicos libertados na solução e fósforo solubilizado, a mobilização do fósforo resultará da libertação de protões durante o processo de absorção de catiões, associado às bombas de protões do plasmalema (Deubel e Merbach, 2005).

Os fosfatos podem ser imobilizados pelos microrganismos nos seus sistemas celulares, ou interagir com substâncias orgânicas secretadas ao nível das raízes ou resultantes da decomposição da matéria orgânica no solo. Os sujeitos à imobilização poderão ser libertados mais facilmente por comparação com os fixados, uma vez que a matéria orgânica está em constante processo de decomposição e mineralização (Vassilev e Vassileva, 2003).

1.3.2.1.1. Fosfatases (Fosfomonoesterases)

As fosfomonoesterases, usualmente designadas por fosfatases, são enzimas mobilizadoras do fósforo pela sua capacidade de hidrolisar as suas ligações éster (Deubel e Merbach, 2005). As fosfatases catalizam a conversão do fósforo de formas orgânicas a inorgânicas, permitindo a continuidade da ciclagem do fósforo nos ecossistemas. Sem a acção destas enzimas, o processo estaria comprometido (Chen et al., 2008).

Ao nível da rizosfera estas enzimas podem ter proveniência das raízes das plantas ou dos microrganismos do solo (Yadav e Tarafdar, 2003).

No solo, a hidrólise do fósforo orgânico é predominantemente mediado pela actividade dos microrganismos apesar das raízes apresentarem também actividade das fosfatases e das fitases (Yadav e Tarafdar, 2003). Isto leva a que elevada proporção de fosfatases extracelulares no solo esteja correlacionada com a biomassa microbiana (Deubel e Merbach, 2005). A distinção entre fosfatases ocorre perante o pH óptimo para a sua actividade (Chen et al., 2008): as ácidas são libertadas tanto pelas raízes das plantas como pelos microrganismos, enquanto que as alcalinas têm maior probabilidade de terem origem microbiana (Deubel e Merbach, 2005). As fosfatases alcalinas e ácidas têm sido extensivamente estudadas dada a sua importância na mineralização do fósforo orgânico (Chen et al., 2008).

Em casos de deficiência de fósforo no solo, aumenta a secreção da fosfatase ácida pelas raízes das plantas, de forma a potenciar a solubilização e mobilização do fosfato (Kumar Das e Varma, 2011).

Estudos demonstraram que os fungos libertam apenas 25% da sua total produção de fosfatases (extracelulares), representando uma actividade 39 vezes superior às enzimas intracelulares, o que demonstra que estas podem desempenhar um papel fundamental ao nível da hidrólise de compostos contendo fósforo (Deubel e Merbach, 2005).

1.3.2.2. Fósforo Orgânico (Fitato)

Os fitatos são as formas mais abundantes de fósforo orgânico ao nível do solo (Lung e Lim, 2006) mas, dada a sua forma natural, não se encontram disponíveis para assimilação directa pelas plantas (Shiu-Cheung e Boon, 2006).

Estes sais do ácido fítico, sobretudo de cálcio e magnésio, encontram-se armazenados em grande parte nas sementes, onde desempenham um papel de reserva, acumulando-se em condições naturais nos vacúolos dos frutos e sementes, impedindo deste modo a excessiva concentração ao nível do citosol. Durante o processo de germinação das sementes, ocorre a degradação dos fitatos por acção das fitases, permitindo a libertação do fósforo e dos cationes necessários ao desenvolvimento embrionário (Varennnes, 2003).

Podem representar entre 50-80% da quantidade total de fósforo ingerido pelos animais alimentados com produtos vegetais. Consequentemente, e pela baixa assimilação deste nutriente no tracto digestivo por parte dos animais monogástricos, devido à sua reduzida eficiência das fitases ao nível gástrico, ocorre uma elevada excreção de fósforo (Hussi et al., 2007).

O fósforo orgânico representa geralmente 50% do total de fósforo insolúvel no solo, estando presente sob a forma de fosfatos de inositol e ésteres de fosfato (como o caso dos fosfolípidos) (Oliveira et al., 2009).

Na fracção orgânica, o fósforo forma sobretudo ligações éster (Vassilev e Vassileva, 2003). Esta fracção é resultante dos resíduos vegetais e animais, que se acumulam na camada superficial do solo. O processo de transformação para a forma inorgânica é mediado por bactérias, fungos e actinomicetas através de processos enzimáticos, e está dependente da relação P:C do resíduo, libertando-se o fósforo inorgânico quando a relação for inferior a 300 (Ferreira, 2009).

Variados tipos de fosfatases, como sendo as fitases, têm a capacidade de potenciar a hidrólise do fósforo orgânico (Yadav e Tarafdar, 2003). Alguns microrganismos têm a capacidade de produzir fitases capazes de hidrolisar os fitatos, mas estes tendem a acumular-se nos solos através da formação de complexas moléculas com Al, Ca e Fe (Gyaneshwar et al., 2002). A biodisponibilidade do fósforo pode ser afectada por estes seres como consequência da excreção de ácidos orgânicos que mobilizam os fosfatos de Al, de Ca ou de Fe (Deubel e Merbach, 2005), pelo que a inoculação destes microrganismos, nomeadamente fungos e bactérias na forma de biofertilizantes, poderá auxiliar no aumento da quantidade de fósforo disponível para as plantas (Tripura et al., 2005).

1.3.2.2.1. *Fitases*

As fitases são enzimas que actuam retirando os grupos fosfato do anel de inositol, permitindo a degradação do fitato. As principais características correspondentes às estruturas básicas das fitases estão englobadas na classe das fosfatases, diferindo apenas no mecanismo catalítico (Gen Lei et al., 2007). São produzidas por uma variedade de microrganismos, incluindo os fungos, sendo excretadas para o exterior da célula (Renneberg, 2006).

Estudos revelaram que as fitases têm a capacidade para uma ligação directa entre o domínio catalítico enzimático e a estrutura molecular do substrato, o que revela uma evolução ao nível dos requisitos nutricionais. Considera-se que essas alterações evolutivas estejam relacionadas com a adaptação dos componentes estruturais específicos não essenciais da molécula (Gen Lei et al., 2007).

Podem ser agrupadas mediante o pH óptimo de actuação (alcalino ou ácido) e mecanismos catalíticos (“histidine acid phosphatases”, “ β -propeller phytase”, “cysteine phosphatases” or “purple acid phosphatases”) (Gen Lei et al., 2007).

Estas enzimas podem derivar de várias fontes, como plantas, tecidos animais e microrganismos (fungos, leveduras, bactérias e protozoários), e mediante essa fonte terão características próprias, nomeadamente:

1. Fungos e leveduras: são glicosadas, usualmente 3-fitases, actuando numa grande variedade de substratos;
2. Bactérias: As fitases bacterianas são não glicosiladas, do tipo “histidine acid phosphatases” ou do tipo fitases alcalinas com uma estrutura “ β -propeller”;
3. Plantas: A maioria das fitases vegetais são do tipo “histidine acid phosphatases” e com um pH óptimo entre 4,5 a 6,0. A sua actividade tem sido detectada em cereais, leguminosas e sementes de oleaginosas (Gen Lei et al., 2007).

Estudos efectuados demonstram no entanto que a obtenção de fitases a partir de microrganismos representa uma maior viabilidade para fins de comercialização. A maioria destas enzimas pertence às sub-famílias de “histidine acid phosphatase” e de fitases alcalinas, exibindo variações consideráveis ao nível da cinética e das propriedades bioquímicas (Gen Lei et al., 2007).

1.3.3. Enxofre

O enxofre é um macronutriente essencial não só para as plantas, como também para todos os outros organismos vivos, dado ser um dos constituintes dos aminoácidos sulfurados e das vitaminas A, B1 e H (Schmalenberger et al., 2008), constituindo cerca de 1% da massa seca dos organismos (Bhoopander et al., 2005).

Algumas moléculas com enxofre têm características redutoras e integram vários processos enzimáticos, nomeadamente no processo de transferência de electrões e na protecção contra o *stress* oxidativo. Além disso, as propriedades quelatantes de outras moléculas com enxofre são úteis às plantas e aos microrganismos para lidar com o *stress* de metais pesados (Schmalenberger et al., 2008).

No solo, o enxofre pode encontrar-se sob diversas formas, desde as formas reduzidas de sulfureto, até às oxidadas de sulfato (Bhoopander et al., 2005).

A redução do sulfato mediado pelas bactérias pode diminuir a disponibilidade de enxofre ao nível da nutrição das plantas, influenciando assim a produção agrícola, enquanto que a oxidação de formas reduzidas origina sulfatos que podem ser absorvidos pelas plantas. As bactérias responsáveis por estes processos podem variar morfológicamente entre formas filamentosas (*Thiobacillus*) e não filamentosas (*Beggiatoa*, *Thiothrix* e *Thioploca*). Entre estes distingue-se o género *Thiobacillus*, uma vez que gera acidez quando o enxofre elementar é adicionado ao solo, podendo levar a um elevado decréscimo do pH, promovendo a dissolução dos sulfatos, disponibilizando-os para as plantas (Bhoopander et al., 2005).

Variados fungos, foram reportados como sendo oxidantes das formas elementares de enxofre, nomeadamente os géneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Microsporeum* (Bhoopander et al., 2005).

O sulfato inorgânico é a principal fonte de enxofre absorvida pelas raízes das plantas porque, apesar de estas terem capacidade de absorção de aminoácidos com enxofre, não conseguem aceder a outro tipo de formas organo-sulfuradas (Schmalenberger e Kertesz, 2007). A maioria do enxofre encontra-se em formas orgânicas (60-90% do total) ao nível do solo, como por exemplo em material vegetal em decomposição e nos estrumes animais, e as moléculas presentes contêm por vezes ligações de carbono-enxofre (Schmalenberger et al., 2008). Ao serem mineralizadas libertam sulfatos que podem ser absorvidos pelas plantas e microrganismos (Ferreira, 2009), onde por sua vez podem ser assimilados pela formação duma ligação éster ou através duma redução assimilatória (Ferreira, e Sousa, 1998).

A concentração de ião sulfato no solo é geralmente baixa, sendo que o seu aumento está relacionado com a disponibilidade de matéria orgânica (Ferreira e Sousa, 1998).

O ciclo do enxofre envolve vários compostos sulfurados, nomeadamente, enxofre elementar, sulfato, sulfito, sulfureto de hidrogénio e tiosulfato, sendo que as formas inorgânicas mais comuns na natureza são H_2S , S , e SO_4^{2-} (Ferreira e Sousa, 1998). Os microrganismos que participam no ciclo do enxofre são extremamente diversos e capazes de intervir em processos de redução ou de oxidação (Bhoopander et al., 2005).

O enxofre é, ao contrário do fósforo, um elemento capaz de sofrer mudanças de valência durante a sua ciclagem, tal como o carbono e o azoto. A conversão do enxofre no solo pode dividir-se nas seguintes fases:

1. Mineralização dos compostos orgânicos;
2. Imobilização do íon sulfato pelos microrganismos;
3. Oxidação, que promove a conversão de formas reduzidas como os sulfuretos, tiosulfatos e enxofre elementar em sulfatos;
4. Redução, que leva à conversão dos sulfatos a formas mais reduzidas como sulfuretos de hidrogénio (Correia, 1980).

O ciclo global do enxofre e a representação da sua ciclagem nas plantas são representados nas figuras 9 e 10.

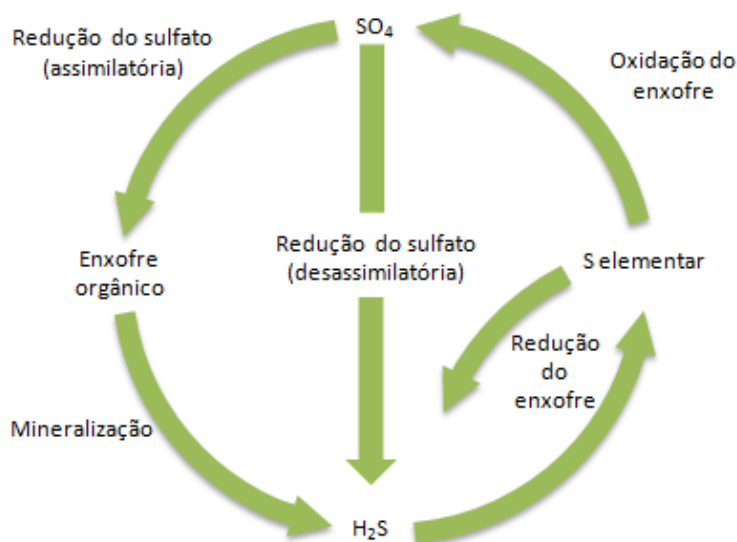


Figura 9 – Ciclo do Enxofre
(Fonte: Ferreira, 1998)

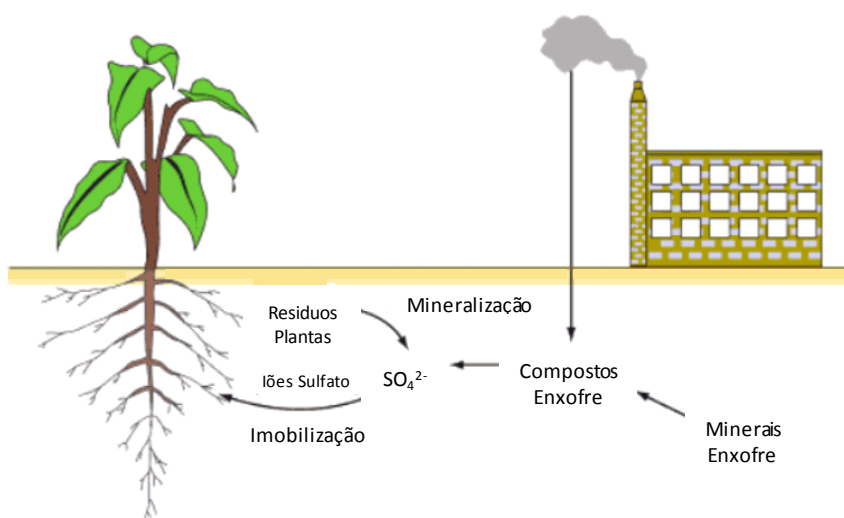


Figura 10 – Esquema representativo da reciclagem do enxofre pelas plantas
(Fonte: Plaster, 2008)

1.3.3.1. Sulfonatos

A maior incidência de estudos relativos aos compostos sulfonados no meio ambiente é relativo aos poluentes, que provêm da elevada utilização destes compostos em corantes e surfactantes (ou tensioactivos, caracterizados pela capacidade de alterar as propriedades superficiais e interfaciais de um líquido) (Schmalenberger et al., 2008).

Muito pouco é ainda conhecido relativamente à estrutura química dos sulfonatos, assumindo-se serem polímeros na sua forma natural, caracterizando-se por conterem uma ligação carbono-enxofre (Schmalenberger et al., 2008), como exemplificado na figura 11.

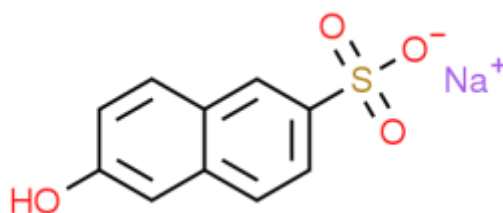


Figura 11 – Estrutura representativa de um sulfonato, com evidência para a ligação carbono-enxofre (sodium 6-hydroxynaphthalene-2-sulfonate)

(Fonte: http://www.matrixscientific.com/sodium6-hydroxynaphthalene-2-sulfonate-135-76-2-c10h7nao4s.html?_SID=U)

Os sulfonatos são uma fonte essencial de enxofre ao nível dos solos agrícolas, constituindo cerca de 30-50% do enxofre total presente, comparativamente aos sulfatos, que representam uma percentagem inferior a 5%, e a outras formas orgânicas como aminoácidos e péptidos, bem como ésteres de sulfato (Ferreira e Sousa, 1998).

Estudos comprovam que o enxofre sob a forma de sulfonato tem uma mineralização mais rápida face a outras formas existentes ao nível do solo, incluindo a ligação sulfato-éster, o que leva a crer que desempenha um factor importante na nutrição das plantas (Ferreira e Sousa, 1998).

Não existe um método de medição da actividade enzimática para testar a capacidade de degradar sulfonatos, visto que esta envolve uma reacção multi-enzimática. Um gene do complexo enzimático, denominado *asfA* foi utilizado com sucesso como marcador molecular para identificar a capacidade de microrganismos degradarem sulfonatos (Schmalenberger e Kertesz, 2010).

A mobilização do sulfonato integra o ciclo do enxofre, sendo mediada por rizobactérias, com envolvimento da oxiredutase *asfA* (Schmalenberger e Kertesz, 2007). A capacidade das bactérias para utilizar sulfonatos como uma fonte de enxofre é uma parte importante do ciclo biogeoquímico deste elemento uma vez que permite a quebra das ligações de carbono-enxofre (Schmalenberger et al., 2008). Estes microrganismos são muito específicos e encontram-se associados às plantas (Schmalenberger et al., 2010).

A capacidade de degradação dos sulfonatos pelos microrganismos tem uma especial importância ambiental no que respeita à ciclagem do enxofre no meio ambiente, nomeadamente na degradação dos sulfonatos xenobióticos (Schmalenberger e Kertesz, 2007). À parte destes, pouco é ainda conhecido sobre os microrganismos responsáveis pela catálise dos sulfonatos naturais, mas sabe-se

que os alifáticos e os aromáticos podem ser utilizados por bactérias, quer como fontes de enxofre, azoto e carbono, quer como fontes de energia. Uma forma de aumentar a concentração de enxofre na rizosfera poderá estar relacionada com a selecção de microrganismos especializados na dessulfurização de fontes orgânicas de enxofre, como o caso dos sulfonatos. Estudos realizados demonstram que a *Pseudomonas putida* tem a capacidade de dessulfurização dos compostos sulfonatos aromáticos para fenóis, embora aconteça com pouca frequência (Schmalenberger e Kertesz, 2007).

Diferentes regimes de fertilização, resultando em diferenças nos níveis de ião sulfato, levaram a uma forte influência sobre as comunidades de bactérias presentes na rizosfera, embora os efeitos da heterogeneidade do solo tenham sido também observados (Schmalenberger et al., 2008). Num estudo realizado conclui-se que quatro anos após a introdução de bactérias capazes de degradar os sulfonatos, ocorreu uma redução em 50% da sua totalidade ao nível do solo em questão (Schmalenberger et al., 2008). Os géneros *Variovorax* e outros membros do *Comamonadaceae* foram identificados como os mais importantes na decomposição dos sulfonatos, independentemente da técnica de cultivo utilizada para fins de produção agrícola (Schmalenberger et al., 2008).

Em relação a fungos, verificou-se que o género *Phanerochaete* tem a capacidade de transformar alguns sulfonatos lineares mas sem remoção do enxofre, e que as enzimas de origem fúngica utilizadas para descoloração das tintas com sulfonatos também não removem o enxofre (Schmalenberger e Kertesz, 2010).

Os microrganismos capazes de degradar sulfonatos poderão assim melhorar o crescimento das plantas pelo fornecimento de enxofre adicional. No entanto, a actividade microbiana é considerada crítica na mineralização de sulfonato, mas os estudos efectuados neste campo cingem-se a microrganismos específicos que melhor desempenham funções neste processo (Schmalenberger e Kertesz, 2007).

2. Materiais e Métodos

2.1. Solos

Foram utilizados dois solos: um recolhido na mina de São Domingos e outro na “Terra Grande” do Instituto Superior de Agronomia.

2.1.1. Solo da Mina de São Domingos

A mina de São Domingos, situada na zona de Mértola, está inserida na Faixa Piritosa Ibérica, uma das mais importantes massas de sulfuretos metalogénicos a nível mundial. Foi explorada para extracção de S e Cu durante os séculos XIX e XX, cessando a sua actividade em 1966 (Varennnes et al., 2010).

O solo usado era ácido, pobre em matéria orgânica e nutrientes, contendo uma elevada concentração de Pb e As (quadro 2), mas com uma disponibilidade baixa: 1,6% do total para o Pb e 0,2% para o As (Varennnes et al., 2010).

Quadro 2 – Características do solo da Mina de São Domingos

Textura	Argilo-Arenosa	Na total (g/kg)	0.3 ± 0.01
pH da água	4.8 ± 0.1	Fe total (g/kg)	69 ± 1
Matéria orgânica (g/kg)	0.22 ± 0.01	Mn total (mg/kg)	17 ± 4
N total (g/kg)	0.01 ± 0.002	Cu total (mg/kg)	91 ± 16
P total (g/kg)	0.44 ± 0.03	Zn total (mg/kg)	47 ± 4
K total (g/kg)	3.1 ± 0.2	Pb total (mg/kg)	6160 ± 587
Ca total (g/kg)	0.2 ± 0.07	As total (mg/kg)	2730 ± 148
Mg total (g/kg)	0.3 ± 0.01		

(Fonte: Varennnes, et al., 2010)

Em virtude da sua actividade anterior, o solo adjacente à mina (cerca de 100 ha) está altamente contaminado por oligoelementos, resultando em efeitos tóxicos para os microrganismos do solo, bem como a grave afectação do desenvolvimento das plantas (Guiwei et al., 2008).

2.1.2. Solo da “Terra Grande”

Inserida na Tapada da Ajuda, a área de solo denominada por “Terra Grande” situa-se junto ao Instituto Superior de Agronomia (ISA), como indicado na figura 12. Neste local recolheram-se várias amostras de raízes de plantas espontâneas, donde se obtiveram as bactérias e fungos utilizados neste estudo.



Figura 12 – Representação da Tapada da Ajuda

(Fonte: <http://www.isa.utl.pt/files/pub/ee/servicos/dag/DOCsIngles/mapatapadal.jpg>)

As características deste solo estão representadas no quadro 3.

Quadro 3 – Características do solo “Terra Grande”

Textura	Franco-Argilosa
pH	8,0
N Kjeldhal (g/kg)	1,9
P (Egner Riehm) (mg/kg)	1048
K (Egner Riehm) (mg/kg)	420

2.2. Colheita de Raízes e Crescimento em Meio Líquido e Sólido

Foram colhidas raízes de plantas espontâneas presentes na Mina de S. Domingos e na Terra Grande que incluíam: *Cynara cardunculus* L. (cardo), *Bromus* spp. (Espigão), *Avena sterilis* L. (balanco-maior), *Aster squamatus* (sprengel), *Hieron* (mata-jornaleiros), e *Hedysarum coronarium* L. (sula) e a maior parte do solo removido por agitação manual.

As raízes foram cortadas em fragmentos de cerca de 8 cm de comprimento e misturadas manualmente. Desta amostra foi pesada 1,00 g (em quadruplicado) e suspensa em 25 ml de solução salina (8,5 g/L de NaCl), agitando-se num agitador rotativo durante dez minutos. O extracto resultante

foi transferido para tubos de centrifuga, onde foram sujeitos a centrifugação durante um período de 10 minutos a 4500 rpm. Após este período retiraram-se 20 ml de sobrenadante, que foi distribuído por quatro frascos autoclavados (5 ml por frasco) com 45 ml de meio mínimo com $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ insolúvel sem agar (quadro 4), procedendo-se à incubação com agitação a 30 °C.

Foi seleccionado um frasco por dia (até quatro dias) tendo sido feitas quatro diluições seriadas 1:10 com água desionizada e autoclavada.

De cada diluição pipetaram-se 200 µl para placas de Petri com meio mínimo com fosfato de cálcio (quadro 4), levando a incubar durante quatro dias a 30 °C. Após este período foi feita a observação das placas e contadas as colónias formadas, tanto de bactérias como de fungos. Seleccionaram-se as 83 colónias de bactérias que apresentavam maior halo e inocularam-se em novas placas de Petri com o meio mínimo mas contendo sulfonato, fitato ou celulose como fontes de S, P ou C, respectivamente (quadro 4), sendo novamente incubadas durante quatro dias a 30 °C.

Quadro 4 – Composição dos meios mínimos utilizados

Fosfato de Cálcio	g/L	Fitato	g/L	Celulose	g/L	Sulfonato	g/L
Glucose	10	Glucose	10	Celulose ⁽¹⁾	5	Glucose	10
NH ₄ NO ₃	5	NH ₄ NO ₃	5	NH ₄ NO ₃	5	NH ₄ NO ₃	5
KCl	0,5	KCl	0,5	KCl	0,5	KCl	0,5
MgSO ₄ .7 H ₂ O	0,5	MgSO ₄ .7 H ₂ O	0,5	MgSO ₄ .7 H ₂ O	0,5	MgCl ₂ .7 H ₂ O	0,412
FeSO ₄ .7 H ₂ O	0,01	FeSO ₄ .7 H ₂ O	0,01	FeSO ₄ .7 H ₂ O	0,01	FeCl ₃ .7 H ₂ O	0,097
MnSO ₄ .H ₂ O	0,01	MnSO ₄ .7 H ₂ O	0,01	MnSO ₄ .7 H ₂ O	0,01	MnCl ₂ .7 H ₂ O	0,012
CaCl ₂	2	CaCl ₂	2	CaCl ₂	2	CaCl ₂	2
Agar	15	Agar	15	Agar	15	Agar	15
Ca ₃ (PO ₄) ₂	4	Fitato ⁽²⁾	4	Na ₂ HPO ₄ . 7H ₂ O	0,769	Na ₂ HPO ₄ . 7H ₂ O	0,769
						Sulfonato ⁽³⁾	0,388

⁽¹⁾ Celulose microcristalina da Merck

⁽²⁾ Fitato de sódio da Sigma-Aldrich

⁽³⁾ *p*-tolueno sulfonato de sódio da Sigma-Aldrich

Nota: O agar utilizado foi da marca Oxoid (LP0028) com baixo teor de cinzas

Todo o material utilizado, incluindo pipetas, frascos, meios mínimos e água, foram esterilizados por autoclavagem.

De igual modo foram seleccionados, a partir das primeiras placas de Petri com meio mínimo e fosfato de cálcio, cinco fungos com características distintas em termos de cor, morfologia e taxa de crescimento, que foram comparados em meio líquido.

2.2.1. Comparação dos fungos em meio líquido

A partir do meio mínimo líquido com fosfato de cálcio insolúvel foram obtidos vários fungos em placas de Petri com meio mínimo e fosfato de cálcio. Daí foram seleccionados cinco fungos com cor e características diferentes, e testados em meio sólido contendo meio mínimo com fosfato de cálcio, fitato, sulfonato ou celulose. Estes foram re-inoculados em novas placas de Petri até se obterem colónias puras e depois comparados em meios líquidos.

Prepararam-se 300 ml de meio mínimo com fosfato de cálcio, fitato ou sulfonato sem adição de agar em frascos com capacidade para 1 L, tendo sido efectuadas três repetições (frascos) para cada tratamento. Em cada frasco foi introduzida uma porção com cerca de 0,5 cm² de agar proveniente das placas de Petri com cada um dos cinco fungos tendo-se deixado três frascos sem inóculo como controlo. Os frascos sofreram agitação durante uma semana à temperatura ambiente.

No final deste período de incubação os meios líquidos com os respectivos fungos foram filtrados em papel de filtro Whatman 42 (meios com sulfonato ou fitato) ou por gaze (meio com fosfato de cálcio), sujeitos a uma lavagem com cerca de 500 ml de água desionizada, passados para vidros de relógio, secos a 65 °C durante 24 horas e no final pesados.

As amostras secas foram calcinadas a 450 °C durante 16 horas, e determinado o fósforo.

No meio líquido foi determinado o pH directamente por medição num potenciómetro, a actividade da fosfatase ácida (meios com fitato ou com fosfato de cálcio) segundo o método de Eivazi e Tabatabai (1977), e o teor de ião sulfato pelo método turbidimétrico, utilizando cloreto de bário (Clesceri et al., 1998), tendo sido sempre realizadas três repetições de laboratório por cada repetição, num total de nove análises, mas foi a média destas três repetições de laboratório que foi usada no tratamento estatístico dos dados.

2.3. Descrição dos Métodos Laboratoriais

2.3.1. Determinação da actividade de fosfatase

Baseado na determinação do *p*-nitrofenol libertado após a incubação do solo com *p*-nitrofenil fosfato durante 1 h a 37 °C.

Soluções e reagentes

- Solução stock – solução tampão universal modificada (MUB – *Modified universal buffer*), que se obteve através da dissolução de 12,1 g de tris(hidroximetil)aminometano (Tris), 11,6 g de C₄H₄O₄, 14 g de C₆H₈O₇ e 6,3 g de H₃BO₃ em 500 ml de NaOH (1 M), diluída com 1000 ml de água destilada;

- Solução tampão universal modificada (MUB) – pH 6,5: titularam-se, para 1000 ml de água destilada, 200 ml de solução stock MUB, adicionando-se HCl a 1 M até obter pH 6,5;

- Solução *p*-nitrofenil fosfato (PNP – *p*-nitrofenil fosfato): dissolveu-se 0,42 g em 40 ml de MUB a pH 6,5 e completou-se com solução tampão com o mesmo pH até alcançar os 50 ml;
- Solução de CaCl_2 (0,5 M): dissolveram-se 73,5 g de CaCl_2 em 1000 ml de água destilada;
- Solução de NaOH (0,5 M): dissolveram-se 20 g de NaOH em 1000 ml de água destilada;
- Solução de NaOH (0,1 M): dissolveram-se 4 g de NaOH em 1000 ml de água destilada;
- Solução padrão *p*-nitrofenol (25 mM): dissolveu-se 1 g de *p*-nitrofenol em 1000 ml de água destilada.

O armazenamento foi feito a 4 °C.

Procedimento (feito em triplicado)

Juntou-se, num frasco Erlenmeyer de 50 ml, 1 g de solo, 4 ml de MUB a pH 6,5 e 1 ml da solução *p*-nitrofenil fosfato, com agitação e incubação durante 1 h a 37 °C. Após este processo adicionou-se 1 ml de CaCl_2 (0,5 M) e 4 ml de NaOH (0,5 M), misturou-se e filtrou-se em papel Whatman nº 42. Deste filtrado mediu-se a absorvância a 400 nm.

- Controlo

Para a obtenção do controlo juntou-se 1 ml de CaCl_2 (0,5 M) com 4 ml de NaOH (0,5 M), e posteriormente 1 ml de solução PNP. O controlo efectou-se imediatamente antes da filtração da suspensão do solo.

- Calibração

A calibração deste método obteve-se através da diluição de 1 ml de solução *p*-nitrofenol em 100 ml de água destilada. Posteriormente pipetaram-se 0, 1, 2, 3, 4 e 5 ml da solução diluída para frascos Erlenmeyer de 50 ml, ajustando para 5 ml de volume final com água destilada, seguindo o processo acima descrito para a amostra de solo após a incubação (Eivazai e Tabatabai, 1977).

2.3.2. Doseamento dos fosfatos

Para a obtenção da concentração de fosfatos os fungos foram calcinados a 450 °C durante a noite. As cinzas foram digeridas por tratamento com HCl (3 M) e posteriormente transferidas para um balão volumétrico de 100 ml em HCl (0,3 M).

2.3.3. Doseamento de sulfatos

Desenvolvido por Tabatabai para a determinação de sulfatos, segue o princípio da precipitação de SO_4^{2-} num meio de CH_3COOH com BaCl_2 , levando à formação de cristais de dimensão uniforme de BaSO_4 , que ficam em suspensão turvando a solução (Clesceri et al., 1998).

A concentração de SO_4^{2-} foi determinada por comparação entre a leitura das amostras e a recta de calibração previamente estabelecida nas mesmas condições do ensaio, com soluções contendo diferentes concentrações de SO_4^{2-} .

Soluções e reagentes

- Solução tampão: dissolveram-se em 500 ml de água destilada 30 g de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 5 g de $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 1,0 g de KNO_3 e 20 ml de CH_3COOH a 99%;

- Solução padrão de Na_2SO_4 contendo 100 mg SO_4^{2-} /L: dissolveu-se 0,1479 g de Na_2SO_4 anidro em 1000 ml de água destilada;

- BaCl_2 : em cristais, cloreto de bário bihidratado da marca Riede-deHaën.

O armazenamento foi feito a 4 °C.

Procedimento

- Calibração

Para obter a recta de calibração pipetaram-se 2, 4, 10, 20, 30, 40 e 50 ml da solução padrão para balões volumétricos de 100 ml, completando-se com água destilada até atingir esse volume. Transferiram-se para um Erlenmeyer de 250 ml os 100 ml de cada diluição padrão preparada, onde se adicionou 20 ml de solução tampão, agitando-se até obter uma solução homogénea. Durante esta agitação adicionaram-se cristais de BaCl_2 , numa quantidade suficiente para a reacção ser total, homogeneizando rapidamente e de forma constante durante cerca de 60 s.

Após o período de agitação descrito no ponto anterior, encheu-se a célula do nefelómetro com a suspensão, colocando-a no equipamento e após 5 min procedeu-se à leitura da turbidez em NTU (*nephelometric turbidity units* - unidades de turbidez nefelométrica), repetindo-se esta operação para cada uma das diluições. Com os valores obtidos determinou-se o ajustamento da recta, a respectiva equação e o coeficiente de determinação (R^2).

- Leitura com a amostra e determinação do SO_4^{2-} (mg/L)

Repetiu-se o processo descrito anteriormente a partir da transferência para o Erlenmeyer, substituindo as diluições padrão pelas amostras a analisar.

A partir da equação da recta de calibração calculou-se a concentração de SO_4^{2-} (mg/L).

- Correção da cor e turbidez da amostra

A correcção da cor e turbidez da amostra é conseguida através da leitura do branco, no qual os cristais de BaCl_2 não são adicionados (Clesceri et al., 1998).

2.3.4. Determinação da concentração de fósforo nos fungos (meio mínimo de fosfato de cálcio)

O P foi determinado, tal como no meio líquido, por colorimetria após formação dum composto corado por reacção com vanadomolibdato de amónio, recorrendo-se posteriormente à leitura no espectrofotómetro a 375 nm.

2.4. Análise Estatística dos Resultados

Os dados foram tratados por análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas usando o Teste de Newman-Keuls a $p \leq 0,05$, com recurso ao programa Statistica da Stasoft. Foram também analisadas as correlações lineares de Pearson entre a biomassa dos fungos e os restantes parâmetros medidos no ensaio em meio líquido.

3. Resultados e Discussão

3.1. Bactérias

Foram obtidas numerosas colónias de bactérias a partir da cultura em meio mínimo líquido com fosfato de cálcio insolúvel. Destas, foram seleccionadas as 83 colónias com maior halo, que foram testadas nos meios sólidos descritos em Materiais e Métodos com fitato, celulose ou sulfonato, assim como fosfato de cálcio insolúvel para comprovar a sua capacidade de o solubilizar. Cresceram apenas as bactérias assinaladas a azul no quadro 5, tendo apresentado no meio com fosfato insolúvel halos de maiores ou menores dimensões, representando diferente capacidade para dissolver fosfato de cálcio.

Nenhuma das bactérias isoladas teve capacidade de degradação de sulfonato, verificando-se apenas uma com desenvolvimento razoável no meio de celulose, pelo que não houve crescimento bacteriano relevante nestes meios. Todas as bactérias cresceram no meio mínimo com fitato, demonstrando que a maior parte, se não todas, das bactérias solubilizadoras de fosfato de cálcio, conseguem também mobilizar o fósforo presente na forma de fitato. De realçar, no entanto, que o fitato de sódio utilizado era solúvel, pelo que há necessidade de comprovar estes resultados utilizando um fitato insolúvel.

Quadro 5 – Crescimento bacteriano em meio sólido

Meios	Desenvolvimento bacteriano																																									
1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42
2	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42
3	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42
4	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42

Meios	Desenvolvimento bacteriano (continuação)																																											
1	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83			
2	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83			
3	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83			
4	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83			

Legenda:

1	Fosfato de cálcio
2	Celulose
3	Sulfonato
4	Fitato

	Colónias com maior desenvolvimento
	Colónias com bom desenvolvimento
	Colónias com algum desenvolvimento
	Colónias sem desenvolvimento

3.2. Fungos



Verificou-se que os cinco fungos se desenvolveram bem nos diferentes meios, à excepção do meio de celulose, onde apenas o fungo 2 apresentou crescimento (quadro 6). Desta forma, pelos fracos resultados de desenvolvimento fúngico, não se avançaram com os estudos em meio líquido com celulose.

Os números 1, 2, 3 e 4 dizem respeito a isolados obtidos a partir das plantas e rizosfera retiradas do solo da “Terra Grande” do Instituto Superior de Agronomia, enquanto que o 5 é referente ao da mina de São Domingos.

Quadro 6 – Crescimento dos cinco fungos seleccionados em meio mínimo sólido

Meio	Fungo				
Fosfato de cálcio	1	2	3	4	5
Celulose	1	2	3	4	5
Sulfonato	1	2	3	4	5
Fitato	1	2	3	4	5

Legenda:

	Colónias com bom desenvolvimento
	Colónias sem desenvolvimento

Até à data de discussão desta tese não houve identificação dos microrganismos em causa, pelo que os mesmos serão referidos neste trabalho apenas pela sua numeração correspondente. Em seguida apresentam-se algumas fotografias do ensaio em meio sólido (figura 13).

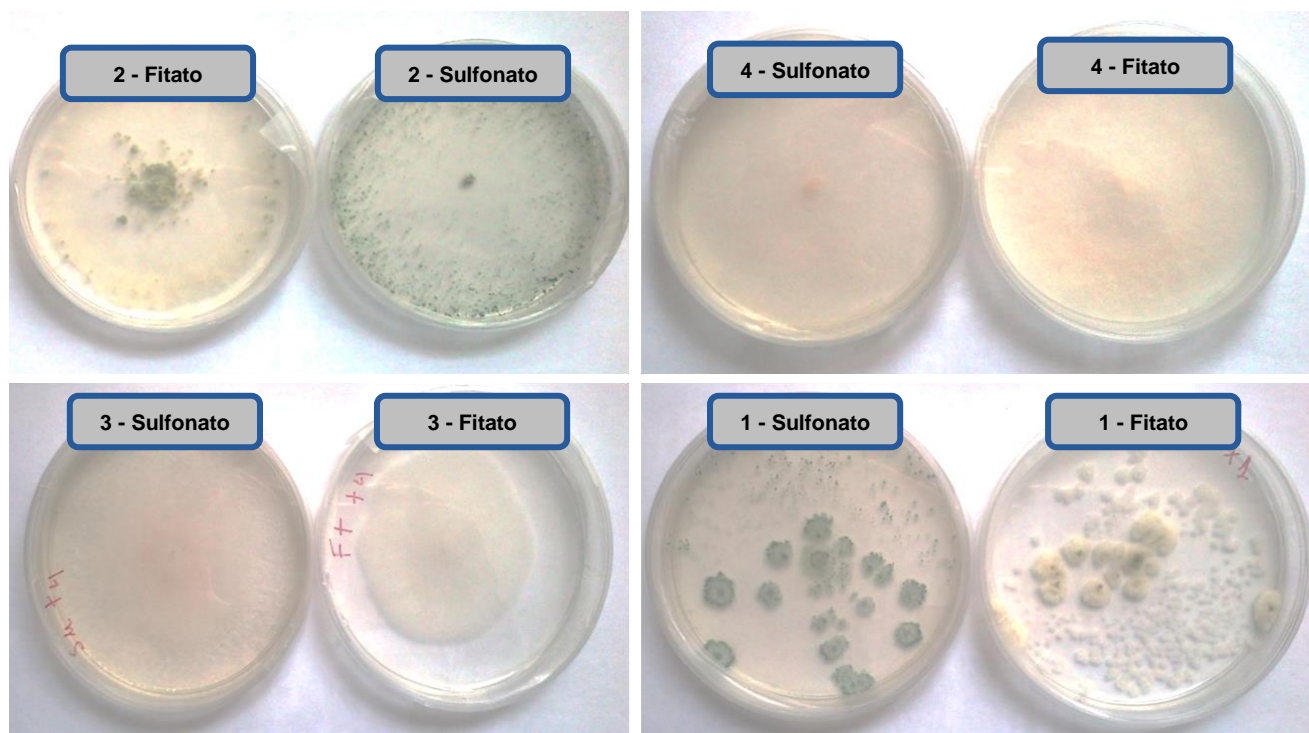


Figura 13 – Desenvolvimento dos fungos (identificados pelo respectivo número) nos meios mínimos sólidos de fitato e sulfonato

Os mesmos cinco fungos foram em seguida comparados em meio mínimo líquido contendo fosfato de cálcio, fitato ou sulfonato, tal como descrito em Material e Métodos. Nas figuras seguintes (figuras 14, 15 e 16) pode observar-se o aspecto dos fungos durante a incubação nos meios líquidos com fosfato de cálcio ou fitato.

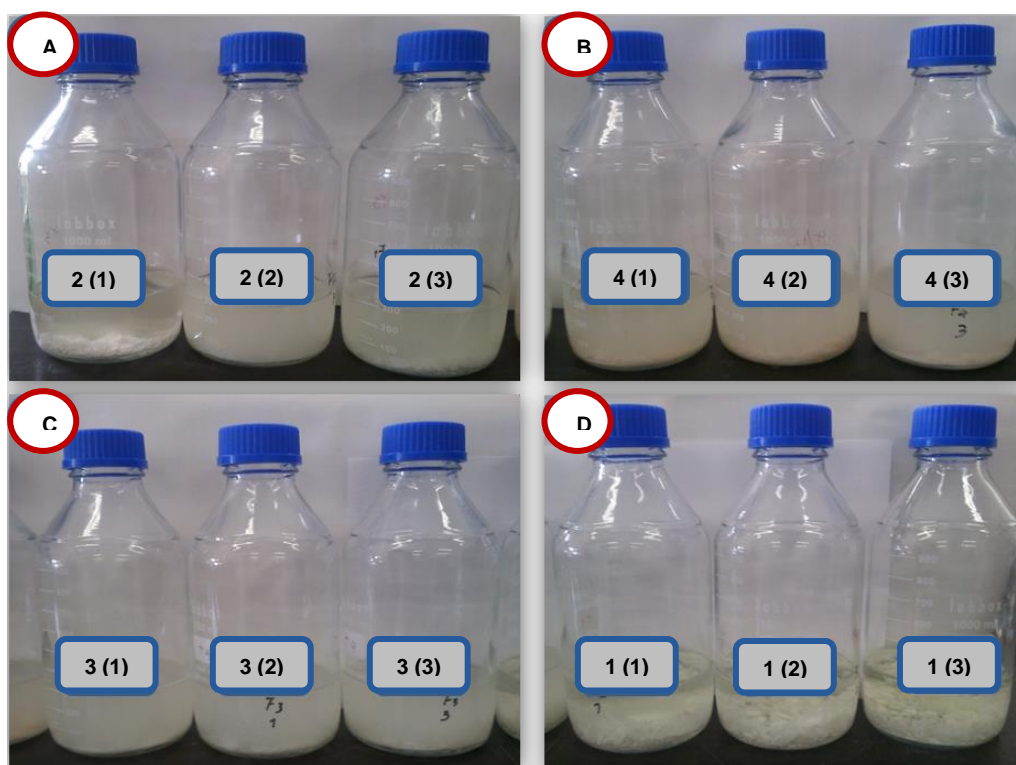


Figura 14 – A, B, C, D: Três repetições de cada fungo no meio mínimo líquido com fosfato de cálcio

Nota: Exemplo de identificação: 1 (1) – Fungo 1, 1ª repetição

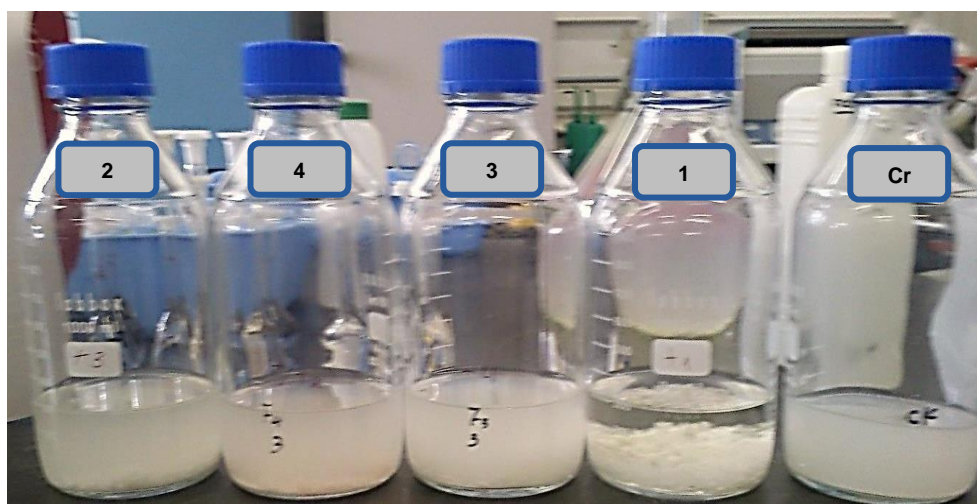


Figura 15 – Primeira repetição de cada fungo (identificados pelo respectivo número) e do controlo no meio com fosfato de cálcio

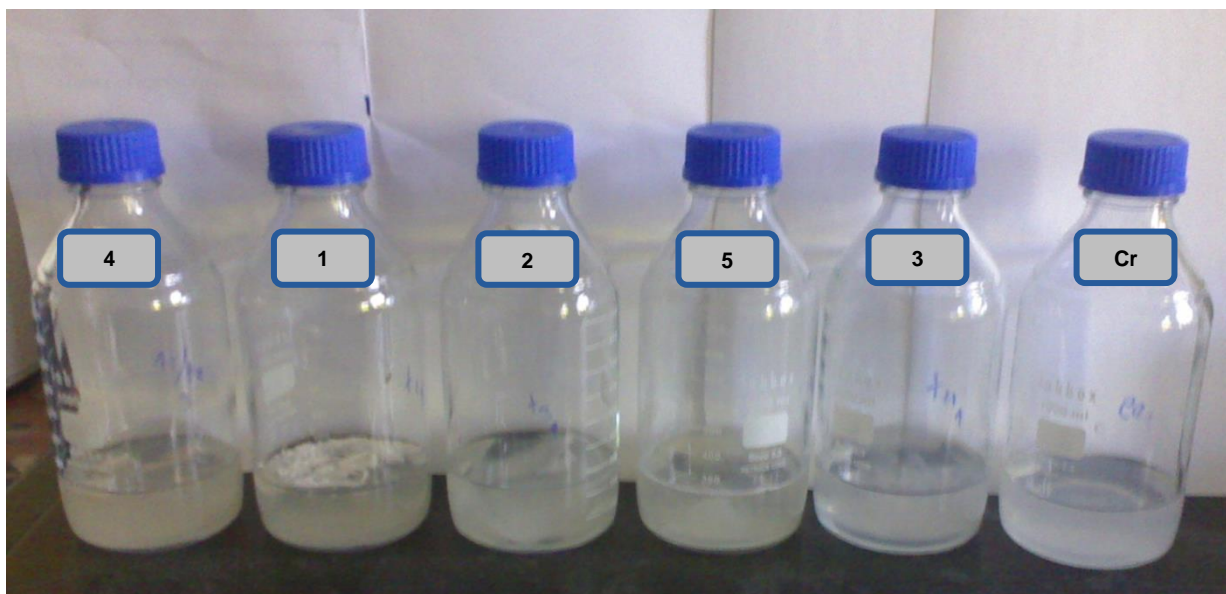


Figura 16 – Primeira repetição de cada fungo (identificados pelo respectivo número) e do controlo para o meio mínimo líquido com fitato

O quadro 7 ilustra o crescimento dos fungos nos respectivos meios.

Quadro 7 – Crescimento dos fungos em meio líquido (g)

Fungos	Meio		
	Fosfato de Cálcio	Fitato	Sulfonato
1	0,106 a	0,418 a	0,064 b
2	0,049 b	0,412 a	0,028 c
3	0,043 b	0,075 c	0,077 a
4	0,008 c	0,156 b	0,029 c
5	0,124 a	0,170 b	0,024 c

Médias na mesma coluna seguidas pela mesma letra não são significativamente diferentes entre si, como avaliado segundo o teste Newman-Keuls a $p \leq 0,05$

Pela análise deste quadro foi possível verificar que no meio de fosfato os fungos 5 e 1 se destacaram no seu desenvolvimento, com massas de 0,124 e 0,106 g, sendo por tal os microrganismos inoculados que apresentaram melhor adaptação a este meio. De igual modo, foi possível verificar que o fungo 4 apresentou extremas dificuldades de crescimento (apenas 0,008 g), pelo que se conclui que o mesmo apresenta aqui uma fraca adaptação.

No meio de fitato houve uma clara evidência de crescimento nos fungos 1 e 2, com valores demarcados relativamente aos restantes, pelo que se deduz que as condições que o meio de fitato lhes proporcionou foram bastante favoráveis. Verificou-se também que os restantes microrganismos apresentaram valores aceitáveis de crescimento, o que leva a crer que este meio apresenta condições propícias ao desenvolvimento dos seres inoculados.

No meio de sulfonato não ocorreram valores de crescimento tão díspares entre fungos, apesar de dois deles (3 e 1) terem apresentado desenvolvimentos de maior ordem, com valores de 0,077 e 0,064 g. Com isto poderemos tirar a elação de que os microrganismos avaliados têm maiores dificuldades de sobreviverem neste meio, sendo assim o sulfonato uma fonte de S com maiores dificuldades de degradação, ou pelo facto dos fungos em questão não serem os mais indicados/adaptados para este tipo de meio devido às suas características inerentes.

O pH do solo é um dos mais importantes factores que influencia a biomassa microbiana, bem como o desempenho da sua actividade (Johannes et al. 2010).

No meio com fosfato de cálcio não ocorreu abaixamento de pH (quadro 8) comparativamente ao meio de controlo, o que não era expectável devido à libertação de protões ou dos diferentes ácidos orgânicos, como sendo o malato, citrato ou oxalato, por parte dos microrganismos, sendo que, o tipo de ácido orgânico libertado influencia a quantidade de libertação de fósforo (Yadav e Tarafdar, 2003). De facto, está descrito que os fosfatos minerais são de forma geral solubilizados por ácidos orgânicos, quer pela diminuição do pH, quer pela precipitação com catiões de Al, Ca e Fe (Gyaneshwar et al., 2002).

A explicação para as diferenças entre o presente ensaio poderá estar na presença de fosfato de cálcio como única fonte de fósforo, o que levará à libertação de iões cálcio quando este é solubilizado, proporcionando o aumento de pH.

De notar, no entanto, que de uma forma geral, e apesar do pH dos meios inoculados ser superior ao do controlo, como acima descrito, foi possível verificar que o maior crescimento dos fungos resultou num pH menor (quadro 7). Whitelaw et al. (1999) demonstraram que o principal mecanismo de solubilização dos fosfatos minerais pelo *Penicillium radicum* foi a acidificação do meio, que potencia a maior solubilização destes elementos. Abaixo do pH 5 a solubilidade em água dos complexos fosfatos ligados a Ca, Al ou Fe aumenta à medida que o pH vai diminuindo.

Quadro 8 – pH do meio líquido

Fungos	Meio		
	Fosfato de Cálcio	Fitato	Sulfonato
Controlo	5,28 c	3,58 c	4,06 c
1	5,69 b	3,42 c	3,56 d
2	6,07 a	2,97 d	3,93 c
3	6,16 a	3,92 a	5,03 b
4	5,89 b	3,81 a	5,31 a
5	5,77 b	3,01 d	5,03 b

Médias na mesma coluna seguidas pela mesma letra não são significativamente diferentes entre si, como avaliado segundo o teste Newman-Keuls a $p \leq 0,05$

No meio de fitato deu-se um abaixamento do pH face ao meio de controlo nos meios inoculados com os fungos 1, 2 e 5. Neste meio ocorreu, como tal, uma relação evidente entre o valor mais baixo de pH e o maior desenvolvimento dos microrganismos (uma vez que os fungos que mais se desenvolveram apresentaram valores de pH de 3,42 e 2,97. A libertação do fósforo a partir do fitato poderá depender, não só de acção solubilizadora, como também da actividade enzimática de fitase.

No meio com sulfonato, não pareceu existir uma relação directa entre o pH e o crescimento dos microrganismos, dado que o maior desenvolvimento fúngico (fungo 3) ocorreu a pH mais elevado (5,03), valor este igual ao do meio inoculado com o fungo que menos se desenvolveu (fungo 5). Não é de estranhar este resultado, visto a quebra da ligação C-S nos sulfonatos estar dependente de um complexo multienzimático, tal como descrito na revisão bibliográfica.

No meio de fosfato de cálcio a maior quantidade de iões libertada (5,31 e 2,86 mg P/L) (quadro 9) ocorreu nos meios onde o pH foi menor (5,77 e 5,69, respectivamente), sendo de igual modo proporcional ao crescimento dos fungos. Isto leva a crer que estes microrganismos se encontram bem adaptados a este meio, libertando o excesso de fosfato no meio que não é necessário para os seus processos metabólicos, o que se pode traduzir num elevado grau de eficiência.

Quadro 9 – Iões fosfato ou sulfato em solução do meio líquido (mg P/L ou S/L)

Fungos	Meio	
	Fosfato de Cálcio	Sulfonato
Controlo	0,13 d	1,71 c
1	2,86 b	1,59 c
2	0,32 c	1,61 c
3	0,38 c	1,41 d
4	0,51 c	1,84 bc
5	5,31 a	1,93 ab

Médias na mesma coluna seguidas pela mesma letra não são significativamente diferentes entre si, como avaliado segundo o teste Newman-Keuls a $p \leq 0,05$

Não foi possível neste trabalho experimental a medição de iões fosfato no meio de fitato até à data de discussão desta tese, pelo que a mesma não poderá ser abordada.

No meio de sulfonato ocorreu maior libertação de iões (1,93 e 1,84 S/L) nos fungos 4 e 5 que apresentaram menor crescimento (0,024 e 0,029 g). Isto pode explicar-se pela dificuldade de adaptação dos fungos ao meio de sulfonato, em que os que menos cresceram tiveram menores necessidades de sulfato para o seu metabolismo, pelo que tiveram hipótese de libertar o excesso deste ião no meio.

Não foi possível a determinação de concentração de sulfato nos fungos por não existir um método laboratorial expedito para esta determinação.

Verificou-se que os fungos 1, 2 e 4 foram aqueles com maior concentração de fósforo (quadro 10). O fungo 4 cresceu pouco e não libertou muito fósforo. Isto poderá estar relacionado com o facto de o microrganismo em questão não estar bem adaptado ao meio, pelo que terá maiores necessidades de utilização deste ião para o seu desenvolvimento, acumulando-o e não permitindo a libertação de iões fosfato em excesso.

Quadro 10 – Concentração de fósforo nos fungos com meio mínimo de fosfato de cálcio (g kg^{-1})

Fungos	Concentração P
1	9,4 a
2	9,5 a
3	6,3 b
4	9,8 a
5	6,9 b

Médias na mesma coluna seguidas pela mesma letra não são significativamente diferentes entre si, como avaliado segundo o teste Newman-Keuls a $p \leq 0,05$

No caso do fungo 1, também com uma elevada concentração de fósforo ($9,4 \text{ g/kg}$), já se observou um maior crescimento ($0,106 \text{ g}$) e uma maior libertação de iões no meio ($2,86 \text{ mg P/L}$).

Não foi possível verificar, porém, a existência duma relação directa de acumulação de fósforo nos fungos com o seu crescimento, pelo que os resultados estarão relacionados com as características intrínsecas de cada um.

Neste trabalho experimental não foi possível a medição da actividade da fitase por falta de disponibilidade para desenvolver uma metodologia apropriada, pelo que apenas foi determinada a actividade de fosfatase ácida (quadro 11).

Quadro 11 – Fosfatase ácida ($\mu\text{mol ml}^{-1} \text{ h}^{-1}$)

Fungos	Meio	
	Fosfato de Cálcio	Fitato
1	0,11 b	0,021 a
2	0,32 a	0,009 b
3	0,31 a	0,011 b
4	0,18 b	0,008 b
5	0,06 c	0,009 b

Médias na mesma coluna seguidas pela mesma letra não são significativamente diferentes entre si, como avaliado segundo o teste Newman-Keuls a $p \leq 0,05$

No meio de fosfato de cálcio não se verifica uma relação directa entre a libertação de fosfatases e o crescimento dos fungos, como era expectável, uma vez “quanto maior a biomassa microbiana, maior a libertação de enzimas” (Yadav e Tarafdar, 2003). Os valores mais elevados desta enzima ($0,32$ e $0,31 \mu\text{mol ml}^{-1} \text{ h}^{-1}$) ocorreram precisamente em dois dos meios inoculados onde se verificou menor crescimento de fungos ($0,049$ e $0,042 \text{ g}$). Isto poderá querer dizer que o que é válido para uma comunidade microbiana complexa, não é necessariamente verdade quando se comparam fungos isolados.

Verificou-se também que o fungo 2, que mais fosfatases produziu, foi o que menos iões fosfatolibertou, pelo que se deduz que o aumento enzimático provavelmente esteve relacionado com a sua menor capacidade de solubilizar o fosfato de cálcio, sendo uma resposta à carência do elemento.

No processo de acção enzimática ocorre um decréscimo do pH do meio (Yadav e Tarafdar, 2003), verificando-se precisamente o oposto neste caso, que poderá ser explicado pela libertação de cálcio, como já anteriormente referido.

As fosfatases desnaturam a valores extremos de pH, sendo que alguns fungos exibem maior actividade de fosfatase a valores mais ácidos (Whitelaw et al., 1999), valores esses que não se verificam em nenhum dos meios inoculados.

Para o meio de fitato não será possível a análise comparativa entre a fosfatase produzida e o número de iões fosfato libertados no meio, uma vez que o ensaio correspondente não teve condições de se realizar até à data.

À semelhança do meio de fosfato de cálcio, era expectável a relação directa da biomassa dos fungos com a produção de enzimas. Isto verificou-se apenas no fungo que apresentou maior crescimento (fungo 1 – $0,418 \text{ g}$), com uma produção de $0,021 \mu\text{mol ml}^{-1} \text{ h}^{-1}$ de fosfatase. Verificou-se também que o pH do meio inoculado com este fungo foi muito semelhante ao do controlo, cujo valor poderá estar relacionado com melhores condições para crescimento do microrganismo.

O fungo 2, que representou dos maiores desenvolvimentos de massa microbiana (0,412 g) não apresentou a correspondente libertação de fosfatases, demonstrando que a determinação da actividade de fosfatase ácida não será a mais apropriada quando se utiliza fitato.

Os resultados do estudo de Yadav e Tarafdar (2003) demonstraram que os fungos tiveram maior capacidade de libertação de fitases do que fosfatases ácidas, seguidas de fosfatases alcalinas. O *Penicillium sp.* foi o que maior secreção de fitase e fosfatase ácida apresentou (no espaço de 3 semanas), ao passo que o *Aspergillus sp.* libertou a maior quantidade de fosfatase alcalina neste período de tempo. A capacidade destes microrganismos solubilizarem as variadas formas de fósforo precipitado encontra-se bem documentado. No entanto, o potencial dos fungos do solo para mediar a disponibilidade de fósforo às plantas através de fontes de difícil disponibilização é ainda pouco conhecido.

Outros resultados obtidos por Yadav e Tarafdar (2003) indicaram que os fungos isolados demonstraram diferentes habilidades de hidrólise do fósforo orgânico. A maior actividade extracelular da fitase face à intracelular sugere uma maior permeabilidade para a fitase face à fosfatase. Isto pode também ser explicado pelo facto das fosfatases estarem presentes nos vacúolos celulares, enquanto que as fitases se encontram junto à superfície das células, que potencia a sua libertação extracelular (Yadav e Tarafdar, 2003).

Acredita-se que o processo de desfosforilação (hidrólise), mediado pelas fitases e fosfatases, mediante o substrato de acção, seja um processo indispensável à nutrição vegetal (Yadav e Tarafdar, 2003).

O fungo *Aspergillus terreus* tem sido referido como um importante produtor de fitase, enquanto que o *Talaromyces rotundus* apresentou óptimos desenvolvimentos de fosfatase (Oliveira et al., 2009).

Gyaneshwar et al., (2002) desenvolveram estudos que comprovam um aumento de 10-15% na produção vegetal, através da acção enzimática mediada por microrganismos, sendo fungos dentro dos géneros *Aspergillus*, *Emmericella*, *Penicillium*, *Bacillus*, os que maior capacidade de produção de fitases e fosfatases apresentaram e, considerados, por tal, como os microrganismos mais eficientes neste processo. O primeiro tem a capacidade de libertação de fósforo a partir de materiais orgânicos, não se verificando a mesma situação para os fosfatos minerais.

Tarafdar and Marschner (1995) demonstraram que a nutrição do milho aumentou em solos suplementados com fitato após a inoculação de fungos micorrízicos, nomeadamente *Glomus mosseae* ou um solubilizador de fosfato (*Aspergillus fumigatus*), conhecidos pela sua elevada actividade fitásica.

A correlação positiva entre a massa dos fungos e de iões fosfato no meio de fosfato de cálcio (0,82) (quadro 12) pode ser explicada pelo facto dos fungos analisados terem capacidade favorável de degradação deste meio. Isto leva a uma libertação no meio do excesso de P além do necessário para os processos inerentes ao desenvolvimento microbiano.

Quadro 12 – Correlações (r) entre massa do fungo e parâmetros medidos

Meio	Iões na solução	pH	Fosfatase	Fósforo nos fungos
Fosfato de Cálcio	0,82***	-0,51*	-0,68**	ns
Fitato	nd	-0,56*	ns	nd
Sulfonato	-0,77**	ns	nd	nd

Legenda: r – coeficiente de correlação de Pearson; nd – não determinado; ns – não significativa;

* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$

No meio de fitato, e como já foi referido, não foi possível até ao momento essa determinação.

Já para o sulfonato, a correlação negativa (-0,77) pode ser interpretada pela possibilidade dos microrganismos avaliados manifestarem dificuldade de sobrevivência neste meio, pelo que todo o sulfato libertado é retirado do meio e utilizado para os seus fins metabólicos, não ocorrendo, por tal, libertação de excesso de sulfato para o meio, o que não constitui um factor positivo nos objectivos deste estudo.

Pôde também avaliar-se que o fungo que libertou mais iões sulfato foi o que menor desenvolvimento apresentou. Isto permite avaliar que este microrganismo ao ter apresentando menor crescimento, necessitou de menor quantidade de sulfato para o seu metabolismo, o que se traduz num factor positivo para a disponibilização de sulfato para as plantas, tal como é pretendido.

Ocorreu uma correlação negativa entre a massa dos fungos e o pH do meio, para os meios de fosfato de cálcio e de fitato como era expectável, dado que a actividade microbiana promove uma acidificação do meio pela libertação de ácidos orgânicos ou protões, como anteriormente já referido.

A fosfatase apresentou uma correlação negativa para o meio de fosfato de cálcio o que sugere que a maior libertação de iões fosfato vai inibir a produção de fosfatase, o que seria expectável. A falta de correlação entre biomassa dos fungos e actividade de fosfatase no meio com fitato já foi anteriormente referida.

A falta de correlação entre biomassa dos fungos e concentração de fósforo nos ditos fungos poderá estar relacionada com o facto de estes controlarem a absorção do elemento, sendo o teor correspondente às necessidades metabólicas de cada fungo.

No meio de fitato não foi possível determinar a concentração de fósforo, como já referido, e no meio de sulfonato não era enquadrável esta determinação.

4. Conclusões

Foi possível obter bactérias e fungos com capacidade para solubilizar fosfato de cálcio e mobilizar fitato. No entanto, o facto de ter havido uma cultura inicial num meio mínimo com fosfato de cálcio limitou a obtenção de microrganismos com outras funções. De facto, nenhuma das bactérias testadas foi capaz de utilizar sulfonato ou celulose, abandonando-se o estudo com estes microrganismos para efeitos desta tese, e apenas um fungo sobreviveu em meio mínimo sólido com esta fonte de carbono.

Pode-se ainda concluir que os fungos estudados foram mais multifuncionais do que as bactérias, porque conseguiram também utilizar o sulfonato. Dado que não foram identificados os isolados obtidos nem testados os seus efeitos no crescimento das plantas, não é ainda possível fazer uma escolha dos mais promissores para obter um inóculo comercial.

No meio de fosfato de cálcio verificou-se que a maior libertação de iões foi proporcional ao crescimento dos fungos. Isto leva a crer que estes microrganismos poderão ter interesse como biofertilizantes.

No meio de sulfonato ocorreu maior libertação de iões nos fungos que apresentaram menor crescimento, o que pode comprometer o seu uso como biofertilizante.

A utilização do meio inicial apenas com fosfato de cálcio poderá ter comprometido estes resultados preliminares, tanto para bactérias como para fungos. Desta forma, é favorável a repetição dos testes com os quatro meios iniciais (celulose, fitato, fosfato de cálcio e sulfonato), de forma a não comprometer no início dos ensaios a adaptação dos microrganismos a esses meios, e não favorecendo apenas os que mais aptidão têm para o fosfato de cálcio.

É de igual modo favorável o avanço de estudo com o meio de fitato insolúvel, bem como o desenvolvimento da metodologia de determinação da fitase.

5. Referências Bibliográficas

- Adesemoye A., Kloepper J., 2009. Plant-microbes interactions in enhanced fertilizer use efficiency. *Applied Microbiology and Biotechnology* 85, 1-12.
- AOAC. 1990. Official methods of analysis. Association Official Agriculture Chemistry. Washington, DC.
- Bayer E., Shimom L., Shoham Y., Lamed R., 1998. Cellulosomes - Structure and ultrastructure. *Journal of Structural Biology* 124, 221-234.
- Bhoopander G., Giang P., Kumari R., Prasad R., Varma, A., 2005. Soil biology, microorganisms in Soils: Roles in Genesis and Functions, Volume 3, Chapter 2 - Microbial Diversity in Soils, 19-55. Springer, Berlin.
<http://link.springer.com/book/10.1007/b137872/page/1>
[Consulta: 11/03/2012]
- Bridge P., Spooner B., 2001. Soil fungi: diversity and detection. *Plant and Soil* 232, 147-154.
- Botany Global Issues Map, Cotton: The Fibre of Life, The McGraw-Hill Companies
http://www.mhhe.com/biosci/pae/botany/botany_map/articles/article_30.html
[Consulta: 10/06/2012]
- Chen W., Wu L., Frankenberger Jr W., Chang A., 2008. Soil Enzyme Activities of Long-Term Reclaimed Wastewater - Irrigated Soils. *Journal of Environmental Quality* 37, 36-42.
- Clesceri L., Greenberg A., Eaton A., 1998. Standard methods for the examination of water and wastewater, 20th Edition. American Public Health Association, Washington.
- Correia A., 1980. Bioquímica dos solos nas pastagens e forragens, 242-244. Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa.
- Deubel A., Merbach W., 2005. Soil Biology, Microorganisms in Soils: Roles in Genesis and Functions, Volume 3, Chapter 9 - Influence of Microorganisms on Phosphorus Bioavailability in Soils, 177-191, Springer, Berlin.
http://link.springer.com/chapter/10.1007/3-540-26609-7_9
[Consulta: 15/04/2012]

Edward A., Chanzyt H., Lamed R., Shoham Y., 1998. Cellulose, cellulases and cellulosomes. *Current Opinion in Structural Biology* 8 (5), 548-557.

Eivazi F., Tabatabai M., 1977. Phosphatases in soils. *Soil Biology and Biochemistry* 9, 167-172.

Esquema representativo da celulose, Scientific Psychic

<http://www.scientificpsychic.com/fitness/carbohydrates2.html>

[Consulta: 10/06/2012]

Esquema representativo de celulosoma, Technische Universität München, Department of Microbiology, MBiotec Group

<http://www.wzw.tum.de/mbiotec/celostruc.htm>

[Consulta: 11/06/2012]

Esquema representativo do ciclo do carbono, TecEco Pt4. Ldt.

http://www.tececo.com/sustainability.role_soil_sequestration.php?print [Consulta: 10/06/2012]

Esquema representativo do ciclo do fósforo, Porto Editora

[http://www.infopedia.pt/\\$ciclo-do-fosforo,2](http://www.infopedia.pt/$ciclo-do-fosforo,2)

[Consulta: 10/06/2012]

FAO (Food and Agricultural Organization of the United Nations). 2012. The state of food and agriculture, Investing in Agriculture for a better future, Part II - World food and agriculture in review: a focus on productivity, 97-106. Roma.

<http://www.fao.org/publications/sofa/en/>

[Consulta: 03/03/2013]

Ferreira J., 2009. As bases da agricultura biológica - Tomo I - Produção vegetal, 130-150. Edibio.

Ferreira W., Sousa J., (Coordenação), 1998. Microbiologia, Volume 1, Capítulo 13 - Microbiologia do Solo, 271-281. Lidel - Edições Técnicas, Lisboa - Porto - Coimbra.

Gen Lei X., Porres J., Mullaney E., Brinch-Pedersen H., 2007. Industrial Enzymes - Structure, Function and Applications, Chapter 29 - Phytase: Source, Structure and Application, 505-529. Springer.

http://link.springer.com/chapter/10.1007%2F1-4020-5377-0_29?LI=true

[Consulta: 11/03/2012]

Guiwei Q., Varennes A., Cunha-Queda C., 2008. Remediation of a mine soil with insoluble polyacrylate polymers enhances soil quality and plant growth. *Soil Use and Management* 24, 350-356.

- Gyaneshwar P., Kumar G., Parekh L., Poole P., 2002. Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. *Plant and Soil* 245, 83-93.
- Hussi A., Farouk A., Greiner R., Salleh H., Ismail A., 2007. Phytate-degrading enzyme production by bacteria isolated from Malaysian soil. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 23, 1653-1660.
- Illmer P., Schinner F., 1995. Solubilization of inorganic calcium – Solubilization mechanisms. *Soil Biology and Biochemistry* 27, 257-263.
- Johannes R., Brookes P., Bååth E., 2010. Investigating the mechanisms for the opposing pH relationships of fungal and bacterial growth in soil. *Soil Biology and Biochemistry* 42, 926-934.
- Kumar Das S., Varma A., 2011. *Soil Biology - Soil Enzymology*, Volume 22, Chapter 2 - Role of Enzymes in Maintaining Soil Health, 25-42. Springer.
http://link.springer.com/chapter/10.1007%2F978-3-642-14225-3_2
[Consulta: 07/03/2012]
- Lung S., Lim B., 2006. Assimilation of phytate-phosphorus by the extracellular phytase activity of soluble phytate of tobacco (*Nicotiana tabacum*) is affected by the availability of soluble phytate. *Plant and Soil* 279, 187-199.
- Oliveira C., Alves V., Marriel I., Gomes E., Scotti M., 2009. Phosphate solubilizing microorganisms isolated from rhizosphere of maize cultivated in an oxisol of the Brazilian Cerrado. *Biome* 41, 1782-1787.
- Plaster E., 2008. *Soil Science and Management*, 5th edition, 3-139; 206-321. Cengage Learning.
http://books.google.pt/books/about/Soil_Science_Management.html?id=GrPgk9IroSgC&redir_esc=y
[Consulta: 20/02/2012]
- Reinhard Renneberg, 2006. *Biotechnology for beginners*, 41-42. Springer-Verlag, Berlin.
http://books.google.pt/books/about/Biotechnology_for_Beginners.html?id=IDYL6793vMkC&redir_esc=y
[Consulta: 18/03/2013]
- Santos I., Venâncio A., Lima N., 2002. *Ecologia dos Fungos*. Micoteca da Universidade do Minho. Braga.

SAREP (Sustainable Agriculture Research and Education Programme). What is sustainable agriculture?

<http://www.sarep.ucdavis.edu/sarep/about/def>

[Consulta: 03/03/2013]

Schmalenberger A., Hodge S., Bryant A., Hawkesford M., Singh B., Kertesz M., 2008. The role of *Variovorax* and other *Comamonadaceae* in sulfur transformations by microbial wheat rhizosphere communities exposed to different sulfur fertilization regimes. *Environmental Microbiology* 10, 1486-1500.

Schmalenberger A., Kertesz M., 2007. Desulfurization of aromatic sulfonates by rhizosphere bacteria: high diversity of the *asfA* gene. *Environmental Microbiology* 9, 535-545.

Schmalenberger A., Telford A., Kertesz M., 2010. Sulfate treatment affects desulfonating bacterial community structures in *Agrostis* rhizospheres as revealed by functional gene analysis based on *asfA*. *European Journal of Soil Biology* 46, 248-254.

Schwarz W., 2001. The cellulosome and cellulose degradation by anaerobic bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology* 56, 634-649.

Stevenson F., Cole M., 1999. *Cycles of Soils: Carbon, Nitrogen, Phosphorus, Sulfur, Micronutrients*, 2nd edition, Chapter 9 – The Phosphorus Cycle, 279-325. John Wiley and Sons, U.S.A.

http://books.google.pt/books/about/Cycles_of_Soils.html?id=KdnWlzM-OHIC&redir_esc=y

[Consulta: 09/04/2012]

Tarafdar J., Marschner H., 1995. Dual inoculation with *Aspergillus fumigatus* and *Glomus mosseae* enhances biomass production and nutrient uptake in wheat (*Triticum aestivum* L.) supplied with organic phosphorus as Na-phytate. *Plant and Soil* 173, 97-102.

Tripura C., Sashidhar B., Podlle A., 2005. Microbial Diversity - Current perspectives and potential applications, Trangenic mineral phosphate solubilizing bacteria for improved agricultural productivity, 375-392. I.K. International Publishing House Pvt, New Delhi.

http://books.google.co.in/books/about/Microbial_Diversity.html?id=4MoZ2vM1d0MC

[Consulta: 21/05/2012]

Varenes A., 2003. *Produtividade dos Solos e Ambiente*, Escolar Editora, Lisboa.

Varenes A., Abreu M., Qua G., Cunha-Queda C., 2010. Enzymatic activity of a mine soil varies according to vegetation cover and level of compost applied. *International Journal of Phytoremediation* 12, 371-383.

Vassilev N., Vassileva M., 2003. Biotechnological solubilization of rock phosphate on media containing agro-industrial wastes. *Applied Microbiology and Biotechnology* 61, 435-440.

- Vodovnik M., Logar R., 2010. Cellulosomes – Promising supramolecular machines of anaerobic cellulolytic microorganisms. *Acta Chimica Slovenica* 57, 767–774.
- Whitelaw M., Harden T., Helyar K., 1999. Phosphate solubilisation in solution culture by the soil fungus *Penicillium radicum*. *Soil Biology and Biochemistry* 31, 655-665.
- Yadav R., Tarafdar J., 2003. Phytase and phosphatase producing fungi in arid and semi-arid soils and their efficiency in hydrolyzing different organic P compounds. *Soil Biology and Biochemistry* 35, 1-7.